D. Becker

Berlijn 1976

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41548901_0021

# Die menschlichen Esterase - Isoenzyme

## Untersuchungen zum Polymorphismus der Esterase D

DISSERTATION
ZUR ERLANGUNG DES AKADEMISCHEN GRADES
DOCTOR MEDICINAE ( Dr. med. )

vorgelegt der
Medizinischen Fakultät des Wissenschaftlichen Rates
der Humboldt - Universität zu Berlin
von

Dipl. Med. Detlef Becker
geboren am 4.Juni 1945 in Meissen

Berlin, den 7.5.76

DEKAN:

Prof. Dr. sc. med. G. L i e b

GUTACHTER:

1. Prof. Dr. sc. med. O. PROKOP

2. Doz. Dr. rer. nat. habil. H.-J. RADERECHT

3. Prof. Dr. sc. med. W. REIMANN

Herrn Prof. Dr. sc. med. O. Prokop danke ich herzlich für die Möglichkeit, am Institut für Gerichtliche Medizin der Humboldt-Universität zu Berlin experimentell arbeiten zu können, und für die Hilfe bei der Fertigstellung dieser Arbeit.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Oberarzt Dr. sc. med. G. Radam, dessen Rat und Hilfe wesentlich zur Bewältigung der biochemisch-genetischen Problematik beigetragen haben.

Herrn Dr. med. H.-J. Strauch und Frau Gudrun Kuntzsch bin ich für die Hilfe bei der Durchführung der stärkegelelektrophoretischen Untersuchungen zu Dank verpflichtet.

Ebenso danke ich Herrn Oberarzt Dr. med. O. Blauärmel (Bezirksinstitut für Blutspende- und Transfusionswesen Berlin) für die Hilfe bei der Beschaffung der Blutproben.

Detlef Becker

Seite

4. Ergebnisse

4.1 Die Auftrennung der Esterase-D-Isoenzyme 58

4.2 Die Verteilung der Esterase-D-Phänotypen unter der Bevölkerung des Berliner Raumes 60

5. Diskussion

5.1 Zur Bestimmungstechnik der Esterase-D-Typen 62

5.2 Vergleich der gefundenen Verteilung mit der theoretisch zu erwartenden HARDY-WEINBERG-Verteilung 63

5.3 Vergleich der gefundenen Genfrequenzen mit den bisher aus der Literatur bekannten Werten 66

5.4 Die Verwendbarkeit des Esterase-D-Polymorphismus im Paternitätsgutachten 75

6. Zusammenfassung 80

7. Literaturverzeichnis 82

8. Thesen 92

Abkürzungen:

| | |
|---|---|
| A | Adenin |
| ACD | Blutstabilisator (Citratpuffer, Glucose) zur Lagerung von Vollblut über 3 Wochen bei + 4°C |
| [illegible] | Blutstabilisator (wie ACD mit Adenin und [illegible]) zur Lagerung von Vollblut über [illegible] Wochen bei + 4°C |
| [illegible] | [illegible] |
| [illegible] | [illegible] |
| C | [illegible] |
| [illegible] | [illegible] |
| [illegible] | [illegible] |
| [illegible] | [illegible] |
| [illegible] | [illegible] |
| [illegible] | [illegible]-Transaminase, cytoplasmatisch |
| [illegible] | [illegible]-Transaminase, mitochondrial |
| [illegible] | [illegible]dehydrogenase |
| [illegible] | [illegible]dehydrogenase |
| [illegible] | [illegible] |
| [illegible] | [illegible]hämoglobin |
| [illegible] | [illegible] |
| [illegible] | [illegible]konstante |
| [illegible] | [illegible]dehydrogenase |
| [illegible] | [illegible]dehydrogenase, cytoplasmatisch |
| [illegible] | [illegible]dehydrogenase, mitochondrial |
| [illegible] | [illegible] |
| [illegible] | [illegible] |
| [illegible] | [illegible] |
| [illegible] | [illegible] |
| [illegible] | [illegible] |
| [illegible] | [illegible] |
| [illegible] | [illegible] |
| [illegible] | [illegible] |
| [illegible] | [illegible]transferase |
| [illegible] | [illegible] Enzymaktivität (Reaktionsgeschwindigkeit) |

# 1. EINFÜHRUNG

## 1.1 DIE NATUR DER ISOENZYME

Die Synthese vieler Enzym- und Strukturproteine wird von mehr als einem Genort gesteuert. An den meisten dieser Genorte kommen wiederum mehrere Allele vor. Diese Heterogenität des genetischen Materials, entstanden durch Duplikation und Mutation der entsprechenden DNS-Moleküle, führt dazu, daß in einer Spezies mehrere Proteine mit der gleichen Enzymaktivität vorkommen.

Zur Charakterisierung dieser Tatsache wurde von MARKERT und MØLLER (1959) der Begriff Isozym (in deutschen Sprachgebrauch Isoenzym) geprägt. So bezeichnete man ursprünglich alle Proteinmoleküle mit der gleichen Enzymaktivität ungeachtet der Art ihrer strukturellen Unterschiede. Auf Grund eingehender Untersuchungen vieler Isoenzyme weiß man heute, daß neben genetischen Ursachen auch "Umwelteinflüsse" (sogn. sekundäre Isoenzyme) für die Variabilität verantwortlich sein können (MARKERT 1968). Man ist deswegen bemüht, den Begriff stärker abzugrenzen. Die IUPAC-IUB Commission on Biochemical Nomenclature schlägt in ihren 'Empfehlungen' (1971) vor, den Oberbegriff "Multiple Enzymformen" an Stelle des Begriffes Isoenzym in seiner ursprünglichen, umfassenden Definition zu verwenden. Die Bezeichnung Isoenzym sollte nur dann verwendet werden, wenn es sich um genetisch bedingte Unterschiede in der Primärstruktur des Proteins handelt (siehe Tabelle 1). Mit diesem Kriterium wird der Isoenzymbegriff eindeutig definiert und somit der Streit beendet, ob polymorphe Enzymformen in Enzymsets zu denen, deren Synthese von verschiedenen Genorten gesteuert wird, zu den Isoenzymen gehören.

Die von HOPKINSON und HARRIS (1971) veröffent-

lamte Einteilung in primäre und sekundäre Isoenzyme entspricht in ihrem Inhalt der oben zitierten "Empfehlung". Die Möglichkeiten zur Entstehung multipler Enzymformen wurden von diesen Autoren folgendermaßen

Tabelle 1: Multiple Enzymformen (nach den Empfehlungen der DGKC (KUPKE-DGKC) und den Angaben von HOPKINSON und HARRIS 1971)

| Gruppe | Ursache der Multiplizität | Beispiele |
|---|---|---|
| **Isoenzyme im engeren Sinn oder Primäre Isoenzyme** | | |
| 1 | genetisch voneinander unabhängige Proteine (verschiedene Genorte) | MDH-M, MDH-C; $PGM_1$, $PGM_2$, $PGM_3$; GOT |
| 2 | Heteropolymere (Hybride) aus zwei oder mehr nicht kovalent gebundenen Polypeptidketten | LDH; ALD; Ea D |
| 3 | Genetische Varianten (Allele) | alle Enzympolymorphismen |
| **Sekundäre Isoenzyme** | | |
| 4 | Proteine, die andere Gruppen gebunden enthalten | Phosphorylase a und b |
| 5 | Proteine, die aus einer Polypeptidkette entstanden sind. | Trypsinogen; Trypsin |
| 6 | Verschiedene Polymere mit und derselben Untereinheit | CHE |
| 7 | Proteine mit verschiedenen Konformationen | MDH, allosterische Enzyme |

Klassifiziert: Primäre Isoenzyme (d.h. Isoenzyme mit genetisch determinierten Unterschieden der Primärstruktur) entstehen durch:

a) Existenz multipler Genorte:

Mehrere Genorte können die Synthese einer Reihe von

Isoenzymen steuern. Das Produkt jedes Genortes ist ein Polypeptid, dessen Primärstruktur durch die Basensequenz der DNS dieses Genortes festgelegt wird. Die Polypeptidketten verschiedener Genorte weisen relativ große Unterschiede in ihrer Aminosäuresequenz auf. Sie stellen im Fall von monomeren Enzymen selbst die Isoenzyme dar. Sie können aber auch miteinander

Tabelle 2: Anzahl der Isoenzyme (i) bei oligomeren Enzymproteinen (n = Anzahl der verschiedenen Polypeptidketten(verschiedene Genorte und/oder Allele); k = Multimerosationsgrad)

| | Dimeres Enzym k = 2 | | Trimeres Enzym k = 3 | | Tetrameres Enzym k = 4 | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| n | i | Hybride | i | Hybride | i | Hybride |
| 2 | 3 | 1 | 4 | 2 | 5 | 3 |
| 3 | 6 | 3 | 10 | 7 | 15 | 12 |
| 4 | 10 | 6 | 20 | 16 | 35 | 31 |

mathematische Formulierung (RADAM 1972)

$$i = \frac{(n + k - 1)!}{k!\,[(n - 1)]!}$$

kombiniert werden, so daß sich oligomere Isoenzyme in der Zusammensetzung ihrer Untereinheiten unterscheiden. Von der Zahl der Untereinheiten hängt es ab, wie viele Hybridformen prinzipiell möglich sind (siehe Tabelle 2). In vivo wird deren Zahl meist begrenzt. Die Strukturdifferenzen der Untereinheiten können so groß sein, daß kein gemeinsamer Einbau in dasselbe Molekül möglich ist. Die Synthese der verschiedenen Untereinheiten kann in unterschiedlichen Zellen des Organismus stattfinden, was ebenfalls die Bildung von Hybridmolekülen verhindert (z.B. bei den X-chromosomal gesteuerten Isoenzymen

der G-6-PD; HARRIS 1975). Die quantitative Verteilung (V) der Hybrid- und "reinen" Enzymformen kann aus der intrazellulären Konzentrationen der Polypeptidketten (a, b, c, ... n) und dem Multimerisationsgrad (k) ermittelt werden:

$$V = ( a + b + c \ldots + n )^k$$

Am Beispiel der Lactatdehydrogenase-Isoenzyme (LDH) soll dies näher erläutert werden. Die Genorte A und B steuern die Synthese zweier unterschiedlicher Polypeptidketten (APELLA und MARKERT 1961, SHAW und BARTH 1959). Der dritte LDH-Genort (Locus C), der 1974 erstmals von ZINKHAM et al. beschrieben wurde und beim Menschen gehemmt ist, wird hier nicht berücksichtigt. Das aktive Enzym besitzt 4 Untereinheiten (k = 4). Es ergeben sich 5 mögliche Isoenzyme mit der Verteilung:

$$V = (a + b)^4 = a^4 + 4a^3b + 6a^2b^2 + 4ab^3 + b^4$$

Eine symmetrische Verteilung der Isoenzyme in der Elektrophorese entsprechend den Binomialkoeffizienten hängt von drei Voraussetzungen ab (HARRIS 1975):

- Gleiche intrazelluläre Konzentrationen (a = b) der Polypeptidketten, abhängig von der Übereinstimmung der Syntheseraten an beiden Genorten und der Stabilität beider Polypeptide.
- Gleiche spezifische Aktivität aller Isoenzyme.
- Assoziation der Untereinheiten nach den Gesetzen des Zufalls.

Wenn eine oder mehrere Voraussetzungen nicht erfüllt werden, findet man asymmetrische Verteilungsmuster im Elektropherogramm. Im Fall der LDH-Isoenzyme ist - wie beiden meisten oligomeren Isoenzymen - die Verteilung asymmetrisch und variiert auf Grund unterschiedlicher Syntheseraten von Organ zu Organ. Es existieren sogenannte organspezifische Muster (siehe Abb. 1), die für die Leberdiagnostik von Organerkrankungen von Bedeutung sind (PFLEIDERER und WACHSMUTH

Abb.1: Die Isoenzyme der Lactatdehydrogenase in verschiedenen menschlichen Seren (nach FRIEDERER und WACHSMUTH 1961)

1961, BERGMEYER 1970, KOWALEWSKI 1972). Unter experimentellen Bedingungen kann in vitro aus äquimolaren Konzentrationen von A- und B-Ketten eine vollständige Rekombination der LDH-Isoenzyme erreicht werden (BOYER et al. 1963). Hierbei ist die Verteilung erwartungsgemäß symmetrisch.

Für die Verteilung monomerer Isoenzyme, deren Synthese von verschiedenen Genarten gesteuert wird, gelten die gleichen Voraussetzungen (mit Ausnahme der letzten, s.o.). In vivo ist die Gleichheit von Syntheserate, Stabilität und spezifischer Aktivität meist nicht gegeben, so daß auch hier hauptsächlich asymmetrische Muster in der Elektrophorese gefunden werden. Bei den Isoenzymen der monomeren Phosphoglucomutase basiert die Verteilung der relativen Aktivitäten in den verschiedenen Zonen des menschlichen Organismus sowohl auf unterschiedlichen Syntheseraten als auch auf der unterschiedlichen Stabilität der Polypeptid-

Ketten von $PGM_1$, $PGM_2$ und $PGM_3$ (Mc ALPINE et al. 1970).

b) Existenz mehrerer Allele am Genort:

Kommen an einem Genort zwei oder mehr Allele in der Population vor, spricht man von Di- bzw. multiplen Allelie. Jedes Allel steuert die Synthese einer eigenen Polypeptidkette. Die Ketten verschiedener Allele eines Genortes unterscheiden sich nur geringfügig, oft nur in einer Aminosäureposition. Bei den heterozygoten Individuen findet man im Falle von monomeren Isoenzymen auch zwei isomorphe Proteine. Für die allgemeinen Ergebnisse gilt wieder das oben dargestellte Prinzip der Bildung von Hybridformen. Als Beispiel seien wieder die LDH-Isoenzyme genannt. Treten an den Genorten A und B mehrere Allele auf, erhöht sich die Zahl der Isoenzyme sprunghaft (siehe Tabelle 2). Ein Individuum, das für einen der beiden Genorte heterozygot ist, wird Träger von 15 Isoenzymen sein. Liegt an beiden Genorten Heterozygotie vor, erhöht sich diese Zahl auf 36.

S e k u n d ä r e  I s o e n z y m e

(d.h. multiple Enzymformen durch Modifikation ein und derselben Primärstruktur nach beendeter Proteinsynthese) entstehen durch Einflüsse aus dem Zellstoffwechsel, die zur Veränderung der Polypeptidkette führen:

- Desaminierung von Glutamin- und Asparaginresten,
- Oxidation von SH-Gruppen bzw. Reduktion von S-S-Bindungen,
- Einbau oder Abspaltung von Phosphorylresten,
- Einbau oder Abspaltung von Kohlenwasserstoffresten unterschiedlicher Struktur (Kohlenhydrate, Fette),
- Spaltung der Polypeptidkette durch proteolytische Enzyme.

Wenn diese Veränderungen nicht alle Molekule in gleichem Ausmaß betreffen, oder als Schritte eines Prozesses darstellen, der von allen Molekülen durchlaufen werden muß, entsteht so eine charakteristische Reihe von multipler Enzymformen. Oft erweisen sie nur

"Proteasdien" im Prozeß der fortschreitenden Denaturierung und den In-vivo-Abbaus der (MOHN 1968).

Multiple Enzymformen können auch dadurch entstehen, daß von einer einzigen Polypeptidkette unterschiedliche Polymere gebildet werden, wie es bei der Glutamatdehydrogenase der Fall ist (Molekulargewichte von 250 000 und 1 000 000). Ähnliche Multimerisationen sind auch bei Nichtenzymproteinen bekannt.

Schließlich besteht die Möglichkeit, daß für ein Enzymmolekül mehrere stabile Raumstrukturen möglich sind. Diese werden als Konformere eines Enzyms bezeichnet (EPSTEIN und SCHECHTER 1966, KAPLAN 1968).

Abzugrenzen von den sekundären Isoenzymen, die ja wahre im Organismus vorhandene, wenn auch nicht genetisch determinierte Variabilität widerspiegeln, sind A r t e f a k t e , die im Verlauf der Isoenzymtrennung entstehen können.

## 1.2 DIE MÖGLICHKEITEN DER TRENNUNG VON ISOENZYMEN

Zur Untersuchung der Heterogenität eines Enzyms eignen sich ganz allgemein Chromatographie,
Elektrophorese (als spezielle Form der Chromatographie),
immunologische Verfahren,
kinetische Untersuchungen und die Ermittlung der Aminosäuresequenz.

In der Praxis wird zur Charakterisierung der Isoenzyme die Elektrophorese am häufigsten herangezogen. Die Gründe dafür sind (IUPAC-IUB 1971):

a) Geringe Schädigung des Untersuchungsmateriels,
b) Hoher Wirkungsgrad,
c) Rationelle Trenntechnik.

Für die Untersuchung ist es wichtig, schädigende Einflüsse, die zur Bildung artifizieller Enzymformen führen können, zu vermeiden. Bei der Elektrophorese kann das Untersuchungsgut in seinem ursprünglichen Zustand (z.B. als Hämolysat oder Serum/Plasma) aufgetragen werden. Das behindert die Auftrennung in der Regel nicht, und die Entstehung von Artefakten durch aufwendige Präparationsschritte, wie sie für kinetische und Sequenzanalysen notwendig sind, wird vermieden.

Die elektrophoretische Auftrennung ist im allgemeinen wirkungsvoller als andere Proteintrennungsmethoden. Man kann allenfalls bei Isoenzymen, deren Synthese von verschiedenen Genorten gesteuert wird, Unterschiede in ihren kinetischen Eigenschaften ($K_m$-Werte, Hemmkonstanten, $V_{max}$) erwarten. Bei den Produkten verschiedener Allele eines Genortes ist das selten (z.B. Isoenzymallele, wo entweder kein oder ein inaktives Protein synthetisiert wird). Man schätzt, daß ungefähr ein Drittel aller mutanten Enzymformen elektrophoretisch nachweisbar sind (HARRISON und HARRIS 1971), weil nur diejenigen Veränderungen der Aminosäure-

quenz erfaßt werden, die zur Ladungsänderung des Moleküls führen, z.B. Ersatz einer neutralen Aminosäure durch eine basische o.ä. (HARRIS 1971).

Die Effektivität der elektrophoretischen Auftrennung kann noch gesteigert werden durch die mehrfache Trennung eines Enzymsystems unter verschiedenen Bedingungen (pH-Veränderung, unterschiedliches Trägermaterial, Veränderung der Ionenzusammensetzung des Puffers). So wandern z.B. die Isoenzyme der alkalischen Placentaphosphatase PL1 und PL3 bei pH = 6,0 gemeinsam; bei pH = 8,6 sind es PL2 und PL3. In diesem Fall gelingt mittels kombinierter Auftrennung bei beiden

| GENOTYP | $Ut^1/Ut^1$ | $Ut^1/Ut^2$ | $Ut^2/Ut^2$ | $Ut^1/Ut^G$ | $Ut^2/Ut^G$ | $Ut^G/Ut^G$ |
|---|---|---|---|---|---|---|
| RELATIVE ENZYMAKTIVITÄT | 100% | 75% | 50% | 50% | 25% | 0% |
| PHÄNOTYP IM ZYMOGRAMM | Ut 1 | Ut 2-1 | Ut 2 | „Ut 1" | „Ut 2" | Ut G |

Tabelle 2: Die Typen der Galactose-1-Phosphat-Uridyltransferase (Ut) unter Berücksichtigung der Allele $Ut^1$, $Ut^2$ (= Duarte-Variante) und des Galaktosämiegen $Ut^G$

pH-Werten die Identifizierung aller drei Allelprodukte, während die Auftrennung bei nur einem pH ein dialleles System vortäuschen oder Ergebnisse liefern kann, die keinem System zugeordnet werden können (ROBSON und HARRIS 1967).

Die Bestimmung der Enzymaktivität erweist sich dann als nützlich, wenn die heterozygoten Träger eines stummen Defektallels erfaßt werden sollen und die Elektrophorese allein "Falsche Homozygotie" vortäuschen würde. An einem Beispiel möge die Problematik der präzisen und richtigen Identifizierung verschiedener Phänotypen bzw. Genotypen eines Enzyms verdeut-

licht werden: Am Genort der Galactose-1-Phosphat-Uridyltransferase (Ut) kommen zwei häufige ($Ut^1$ und $Ut^2$ = Duarte-Variante) und mehrere seltene Allele vor (KALCKAR et al. 1966, BEUTLER et al. 1965, 1966, GITZELMANN et al. 1967, 1973, HEILMANN et al. 1968, CHACKO et al. 1971, BISSBORT et al. 1972, NG et al. 1973, BEUTLER 1973, KOHN et al. 1974). Von den seltenen ist für europäische Populationen das Defektallel $Ut^g$, dessen homozygote Träger an Galaktosämie erkranken, von Bedeutung (KALCKAR et al. 1966, NG 1971, KALOUD und GITZELMANN 1971, GITZELMANN et al. 1973, BEUTLER 1973, COHN 1973). Tabelle 3 zeigt die Phänotypen bei Aktivitätsmessung und elektrophoretischer Auftrennung mit den zugehörigen Genotypen. Keine der beiden Methoden allein gestattet eine eindeutige Zuordnung aller Phänotypen zu den entsprechenden Genotypen. Es besteht also keine Eins-zu-eins-Beziehung zwischen Phänotyp und Genotyp (KITTNER und WEIMER 1975). Man wird bei Verwendung des Ut-Systems zum Vaterschaftsgutachten die Elektrophorese zur Auftrennung bevorzugen, weil mit ihr die häufigen Phänotypen Ut 1, Ut 2-1 und Ut 2 präziser als mit der Aktivitätsbestimmung typisiert werden. Aktivitätsbestimmung oder Familienuntersuchung wären dann als Zusatzuntersuchungen notwendig, um das heterozygote Galactosämiegen zu erfassen.

Für Screening-Untersuchungen zur Erfassung von homozygoten und heterozygoten Trägern dieses Defekt-allels ist die Messung der Enzymaktivität geeigneter, wobei auch hier zur Klärung der 50%-Werte zusätzliche Untersuchungen notwendig sind (Elektrophorese oder Familienuntersuchung).

An diesem Beispiel wird deutlich, daß alle Varianten eines Enzyms nur durch die Kombination mehrerer Methoden erfaßt werden können und daß es von der Fragestellung abhängt, welche Methode zur routinemäßigen und welche zur zusätzlichen Untersuchung eingesetzt wird.

Wenn es jedoch um die Auffindung neuer Isoenzyme geht, steht die Überlegenheit der Elektrophoresen gegenüber allen anderen Methoden eindeutig fest (HARRIS 1974). So ist es möglich geworden, mit Hilfe der Stärkegelelektrophorese die Produkte von 28 verschiedenen Allelen (lokalisiert an drei Genorten) nachzuweisen (HOPKINSON und HARRIS 1969, RADAM 1972, BECKER 1974, BLAKE und OHNO 1975). Demgegenüber erhält man bei chromatographischer Auftrennung oder Aktivitätsbestimmung nur 2 bzw. 3 Varianten (JOSHI und HANDLER 1965, DAWSON und MITCHELL 1969, DAWSON und JAEGER 1970).

Ein weiterer Vorteil der elektrophoretischen Isoenzymtrennung ist, daß sie einfach und schnell durchführbar und entsprechend breit anwendbar ist.

Aus diesen Gründen stützt sich auch die Nomenklatur der Isoenzyme wesentlich auf die Elektrophorese. Der Enzymname wird mit einer Zahl versehen, die entsprechend der Mobilität in Richtung Anode unter definierten Bedingungen festgelegt wird (IUPAC-IUB 1971). Die Formen mit der höheren Beweglichkeit erhalten nach dieser Empfehlung die niedrigeren Ziffern. Weil diese Art der Nomenklatur noch relativ jung ist und sich noch nicht allgemein durchgesetzt hat, findet man in der Literatur häufig Bezeichnungen nach der Verteilung in den Geweben, nach der Substrataffinität u.a., die Gelegenheit zu Verwechslungen geben können. Für die Kennzeichnung seltener genetischer Varianten ist es üblich, den Namen der Stadt, der Universität oder des Landes ihrer Entdeckung zu verwenden. Die Kenntnis über strukturelle Unterschiede zwischen den einzelnen Isoenzymen ist bisher so gering, daß eine Nomenklatur, die auf strukturellen Überlegungen basiert, zur Zeit nicht möglich ist. Wo solche strukturellen Details im Einzelfall bekannt sind (s.S. VII, LDH) werden sie zur näheren Kennzeichnung der Isoenzyme -proteine herangezogen.

Abschließend sei zu den Überlegungen zur Iso-

enzymaufspaltung erwähnt, daß auch immunologisch sehr empfindlich verschiedene Isoenzyme voneinander getrennt werden können, vorausgesetzt, die Unterschiede betreffen die determinante Gruppe des Makromoleküls. Die praktische Anwendung wird allerdings dadurch eingeschränkt, daß zur Herstellung entsprechender Antiseren die "saubere" Präparation der einzelnen meist Enzymproteine Voraussetzung ist.

## 1.2 DIE ENTSTEHUNG UND ÖKOLOGISCHE BEDEUTUNG DES ENZYM - UND PROTEINPOLYMORPHISMUS

Allele entstehen durch Mutationen in der Desoxyribonukleinsäure (DNS) des entsprechenden Genortes. Die DNS ist ein kettenförmiges Molekül. Die benachbarten Desoxyribosemoleküle sind an ihren $C_3$- und $C_5$-Atomen über einen Phosphatrest miteinander verbunden und tragen am $C_1$-Atom eine der heterozyklischen Basen Adenin (A) und Guanin (G)(Purinbasen) beziehungsweise Cytosin (C) und Thymin (T)(Pyrimidinbasen). Die Sequenz dieser Basen im DNS-Molekül determiniert die Aminosäuresequenz der zu synthetisierenden Polypeptidkette. Je drei Basen bilden dabei ein Codewort, das einer Aminosäure entspricht. Mutationen können nun entweder eine einzelne Base (Punktmutationen) oder größere Abschnitte des Gens betreffen (Austausch, Umkehrung, Verdoppelung des Gens; Übersicht bei RAPOPORT 1975, HARTMAN und SUSKIND 1972).

Im Zusammenhang mit der Entstehung multipler Allele eines Gens interessieren in erster Linie die Punktmutationen, deren Auswirkungen auf den Phänotyp (biochemische und immunchemische Eigenschaften der Polypeptidkette) hier diskutiert werden sollen.

a) Austausch einer Base gegen eine andere:

Werden homologe Basen ausgetauscht, spricht man von Transition (Purinbase gegen Purinbase usw.). Diese Form der Punktmutation wird unter Einwirkung desaminierender Reagenzien beobachtet (RAPOPORT 1975). Als Transversion bezeichnet man den Austausch einer Purinbase gegen eine Pyrimidinbase und umgekehrt. Das ist die bei Spontanmutationen häufigere Form. Ihr genauer Mechanismus ist unbekannt.

Auf Grund der Struktur des genetischen Codes und der funktionellen Bedeutung der einzelnen Abschnitte der Polypeptidkette für Struktur und Funktion eines Enzyms existieren mehrere Möglichkeiten für das

Ausprägung einer solchen DNA-Veränderung im Phänotyp (HARTMAN und SUSKIND 1972):

- keine Änderung des Phänotyps

Auf Grund der Degeneriertheit des genetischen Codes werden vorallem Austausche der 3. Base eines Triplets synonym sein. So können aus dem Codon AGA durch Austausch der 3. Base AGT oder AGG oder AGC entstehen, die alle die Aminosäure Serin kodieren.

- schwer nachweisbare, minimale Veränderung des Phänotyps

Der Austausch einer Aminosäure durch eine andere mit sehr ähnlicher Struktur und ähnlichen Eigenschaften führt dazu, daß mit gängigen Methoden (Elektrophorese, Chromatographie, Aktivitätsbestimmung und Immunchemie) die Veränderung des Phänotyps nicht nachgewiesen werden kann. Zum Beispiel der Austausch von GAA (Leucin) gegen TAA (Isoleucin).

- Entstehung eines neuen Phänotyps

Wird eine Aminosäure durch eine mit völlig anderen Eigenschaften ersetzt (z.B. CTA (Aspartat) gegen CGA (Alanin) u.a.), werden auch die Eigenschaften der Polypeptidkette stark verändert. Von der Lokalisation des Austausches (Stellen, die die Konformation bestimmen, Innen- oder Außenseite des gefalteten Moleküls, aktives Zentrum, determinante Gruppe) hängt es ab, ob Veränderungen der elektrophoretischen, immunologischen und/oder funktionellen Eigenschaften (Enzymaktivität, Sauerstoffbindungsfähigkeit u.ä.) auftreten. Die Bezeichnungen "neutrales Allel" und "Defektallel" stellen nur die Grenzwerte dieses weiten Bereiches der phänotypischen Ausprägung einer Änderung des Genotyps dar

- stark veränderter Phänotyp, inaktives Protein

Basenaustausche, die entweder zur Bildung oder zur Beseitigung eines Nonsens-Triplets führen, [illegible]

Bildung verkürzter bzw. verlängerter Polypeptidketten zur Folge. Beide Varianten sind in der Regel inaktiv.

b) Insertion und Deletion von Basen

Durch Spreizung des Abstandes zwischen zwei benachbarten Basen im DNS-Strang während der Replikation kann es zum Einschieben einer oder mehrerer Basen in die reguläre Sequenz kommen. Der Verlust der Paarungsfähigkeit einer Base durch chemische Veränderung hat ihre Deletion des Nukleotids zur Folge. Betreffen Insertion und Deletion eine oder zwei Basen, wird vom Ort der Veränderung an das gesamte Ablesemuster für die Transkription verschoben (frame shift mutation). Es entsteht ein funktionsuntüchtiges Polypeptid mit völlig neuer Aminosäuresequenz. Das entstandene Gen wird als defektallel zu bezeichnen. Werden dagegen 3 Nukleotide eingeschoben oder ausgelassen, sind die Veränderungen wesentlich geringer und entsprechen denen bei Basenaustausch

c) Mutationen in Regulator- oder Operatorgen

Werden Regulatorgen oder Operatorgen von einer Punktmutation betroffen, kommt es entweder zur ungehinderten konstitutiven oder zur vollständig gehemmten Transkription. Letzteres täuscht bei der Untersuchung des Phänotyps ein defektes Strukturgenallel vor. Die eindeutige Abgrenzung echter Defektallele, die ein funktionsuntüchtiges Protein synthetisieren, von solchen Regulatorgen- und Operatorgenmutationen gelingt nur dann, wenn mit immunologischen Methoden der Nachweis des inaktiven Enzymproteins gelingt. Kann dieses nicht nachgewiesen werden, ist die Unterscheidung nicht möglich, weil eine Strukturgenmutation auch den determinanten Bereich so verändern kann, daß der verwendete Antikörper das Antigen nicht mehr erkennt.

Zur Beurteilung der Chancen für die Entstehung neuer Allele gehört neben der Kenntnis der Fehlerwahrscheinlichkeit des genetischen Apparates (Mutationsrate) auch

die der Nukleasen präsentieren. Treten Abweichungen bei der Watson-Crick-Basenpaarung auf, so ist es vielen Zellen möglich, mit Hilfe spezieller "Reparaturenzyme" defekte Abschnitte der Basensequenz zu entfernen und durch die regulären zu ersetzen (HANAWALT 1975). Bei diesem Reparaturprozeß wird die DNS in der Nähe der schadhaften Stelle durch eine Endonuklease "angeschnitten". Anschließend werden durch die 5' → 3' - Exonuklease-Aktivität der DNS - Polymerase I (Kornberg-Enzym) die oligonukleotidisch mit den defekten Basen versehenen Stränge hydrolysiert. Die entstandene Lücke wird durch eine Re-Novo-Synthese mit Hilfe derselben DNS-Polymerase I geschlossen. Der Komplementärstrang dient dabei als Matritze. Letzter Schritt ist die Knüpfung der Phosphodiesterbindung zwischen neuem DNS-Stück und dem alten DNS-Strang durch eine DNS-Ligase. Daß es auch beim Menschen eine DNS-Reparatur gibt, wurde indirekt durch die Aufklärung der Pathogenese der Hautkrankheit Xeroderma pigmentosum bewiesen. Dieses Patienten fehlt das Enzym Endonuklease. Unter Einwirkung von UV-Licht entstehende Dimere (insbesondere Thymin-Dimere) können nicht beseitigt werden wie bei Gesunden. Die Patienten sind extrem empfindlich gegenüber ultraviolettem Licht (HANAWALT 1979).

An diesem reparierenden Enzymsystem ist allerdings noch vieles unklar. So ist u. a. nicht bekannt, wie die Endonuklease die schadhaften Stellen auf dem großen DNS-Molekül erkennt.

Trotz seiner großen Genauigkeit arbeitet aber auch dieses System mit einer gewissen Toleranzbreite. Sonst gäbe es keine Mutationen, und dies würde in eine "evolutionäre Sackgasse" führen. Interessant ist, daß mit großer Wahrscheinlichkeit die Vorgänge der genetischen Rekombination durch dieselben Enzyme katalysiert werden wie die der DNS-Reparatur.

Die Mutationsraten für Punktmutationen werden (wie gesagt) auf $10^{-7}$ bis $10^{-9}$ pro Generation und

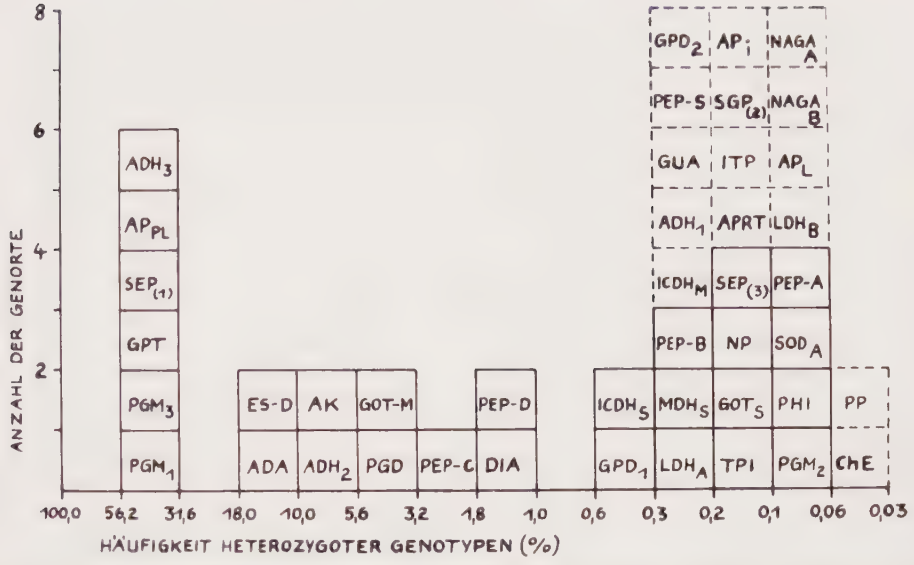


Abb. 2: Die Verteilung der Häufigkeit heterozygoter Genotypen an menschlichen Isoenzymgenorten ( nach HARRIS et al. 1974 )

Die Autoren sprachen dann von Polymorphismus, wenn die Frequenz des häufigsten Allels in der Population gleich oder kleiner als 0,99 ist. Ein Allel bezeichnen sie dann als häufig, wenn seine Frequenz mindestens 0,005 beträgt. Allgemein üblich in der Populationsgenetik ist hierfür der Grenzwert von /0,01 (SPERLICH 1973). NEI und ROYCHOUDHURY (1974) fanden für Genorte, die die Synthese von Proteinen steuern, Werte, die denen von HARRIS et al. (1974) vergleichbar sind. Bei europiden, negriden und mongoliden Populationen sind 24 bis 31 % aller Loci polymorph. Für Blutgruppen - loci liegt dieser Wert höher bei 37 bis 72 %.

Wenden wir uns nun der Häufigkeitsverteilung der verschiedenen Allele zu. Abbildung 2 zeigt die Verteilung der Genorte nach dem Logarithmus der relativen Häufigkeit heterozygoter Genotypen in der Population (HARRIS et al. 1974). Die Verteilung ist asymmetrisch und zweigipfelig. Den ersten, schmaleren Gipfel bilden 9 Loci, deren Heterozygotenhäufigkeit 32 bis 50 %

beträgt. 21 Genorte liegen mit ihrer Heterozygotenfrequenz im Bereich von 0,3 bis 12 % und bilden damit ein flaches Plateau zwischen beiden Gipfeln. Der größte Teil aller Genorte (n = 26) bildet den zweiten, breiteren Gipfel. Hier liegt die Häufigkeit heterozygoter Typen unter 0,3 %.

Weiterhin ist zu beachten, daß die Häufigkeit der für seltene Allele heterozygoten Typen an nichtpolymorphen und an polymorphen Loci gleich ist (ca. 1,1 Heterozygote pro Genort und $10^3$ Individuen). Eine Ausnahme bildet in dieser Hinsicht die alkalische Placentaphosphatase (HARRIS 1971), die aber hier außer acht gelassen wurde. Polymorphe Genorte unterscheiden sich also nur dadurch von den übrigen, daß die Träger zweier oder mehrerer häufiger Allele in der Population sind. Seltene Allele kommen bei allen Loci ungefähr gleich häufig vor. Die Tatsache, daß sehr viele Genorte nur seltene Allele tragen, entspricht den Bedingungen des klassischen Populationsmodells der Genetik. Dieses setzt voraus, daß es unter bestimmten Umweltbedingungen nur eine stabile Zusammensetzung des Genpools gibt, bei der alle Gene durch das jeweils günstigste Allel besetzt wären. Der genetische Idealtyp wäre das vollkommen homozygote Individuum (SPERLICH 1973).

Auf die Problematik des Enzympolymorphismus angewendet, bedeutet es, daß nachteilige Allele durch die gerichtete natürliche Selektion wieder aus der Population verschwinden. Ein Gleichgewicht wäre dann erreicht, wenn sich Eliminations- und Mutationsrate entsprechen. Die Frequenz rezessiver Allele wäre dann:

$$\bar{q} = \sqrt{\frac{u}{s}}$$

$\bar{q}$ : Frequenz des nachteiligen Gens

u : Mutationsrate

s : Selektionskoeffizient

Für dominante Allele gilt:

$$q^{-} = \frac{a}{h \cdot s}$$

h : Dominanzgrad

Ein vorteilhaftes Allel würde dagegen eine ständige Zunahme seiner Frequenz bis zur vollständigen Verdrängung des präexistierenden erfahren. Gleichgewicht würde erst dann erreicht, wenn:

$$q^{+} \longrightarrow 1$$

$q^{+}$: Frequenz des vorteilhaften Allels

Das bedeutet aber, daß jeder genetische Polymorphismus insofern nur scheinbar vorhanden ist, als bei populationsgenetischen Untersuchungen der einzelnen Genorte lediglich "Momentaufnahmen" des langwierigen evolutionären Prozesses der allmählichen Verdrängung eines Allels durch ein anderes, vorteilhafteres gemacht werden (HARRIS 1975). Unter Bezug auf die Daten von HARRIS et al. (1974) und von NEI und ROYCHOUDHURY (1974) heißt das, daß der Zustand, in dem sich die Loci mit nur zwei Allelen befinden (Abb. 2: zweiter, breiter Gipfel der Verteilung), Ausgangs- und Endpunkt der Entwicklung ist (genetisches Gleichgewicht). Alle polymorphen Genorte stellen Zwischenstadien auf dem Weg zum Gleichgewicht dar. Aus der Frequenz der Allele allein kann nichts über die Richtung der Entwicklung gesagt werden. Die Genorte mit großer Heterozygotenhäufigkeit (Abb. 2: erster, schmaler Gipfel) befinden sich gewissermaßen am "Wendepunkt". Über die zwischen den beiden Gipfeln liegenden Loci läßt sich nicht aussagen, ob sie sich gerade erst vom präexistierenden Gleichgewicht entfernt haben oder schon "kurz" (gemessen an den Zeitspannen für evolutionäre Prozesse) vor der Erreichung eines neuen stehen.

Zu einer weiteren Hypothese über die Entstehung

genetischer Polymorphismen gelangt man bei Anwendung des Balance-Modells der Population. Hier besteht Gleichgewicht, wenn die Allelfrequenzen in benachbarten Populationen aneinander gleichen (SPERLICH 1971). Balancierende Selektionsmechanismen können durch Überdominanz (z.B. Hb S - Frequenz in Malaria-Endemiegebieten) und häufigkeitsabhängige Selektion bestimmter Allele entstanden kommen.

Bei der Schwierigkeit, in humanen Populationen die Selektivität bestimmter Typen polymorpher Genorte und Isogenreihe einzuschätzen, ist es auch in konkreten Fall kaum möglich, die Ursachen der Häufigkeiten der einzelnen Allele eines polymorphen Genortes exogenen - angenommen die wenigen Fälle, wo selektiver Vorteil bzw. Nachteil leicht zu erkennen sind (z.B. heterozygote Träger des Hb S - Gens, homozygote Träger von Defektallelen).

Das häufige Vorkommen von polymorphen Genorten und das Fehlen nachweisbarer Fitness-Unterschiede zwischen den Trägern der verschiedenen Genotypen (insbesondere bei Enzympolymorphismen) rückten die dritte Theorie, die zur Erklärung des Polymorphismus herangezogen werden kann, in den letzten Jahren mehr stark in den Vordergrund. FISHER (1958) führte in den zwanziger Jahren den Begriff "genetischer Zufallsdrift" ein. Anlaß zur gegenwärtigen Aktualität dieses Begriffes bildeten die vergleichenden Untersuchungen zwischen homologen Proteinen verschiedener Spezies (KIMURA 1968,1969, KING und JUKES 1969). KIMURA (1968) stellte die Hypothese auf, daß die Aminosäuredifferenzen dieser Proteine das Resultat von Fixationen und Zufallsdrift seien. KING und JUKES (1969) wandten diese Hypothese auf alle Enzym- und Proteinpolymorphismen an und sprachen pragmatisch von "Non-Darwinian Evolution".

Die genetische Drift wird dann zum Hauptfaktor der Entwicklung, wenn der selektive Vorteil eines Gen-

teil sehr viel kleiner ist als der reziproke Wert der effektiven Populationsgröße (CROW 1972):

$$|s| \ll \frac{1}{N_e}$$

$N_e$: effektive Populationsgröße
$s$ : Selektionskoeffizient

Das heißt, daß es in kleinen Populationen (großer Wert von $1/N_e$) eher zur Driftwirkung kommen kann als in großen. Anders ausgedrückt: In großen Populationen muß allein der absolute Betrag des selektiven Vorteils eines Allels der Größe Null nähern, um ein von Selektionsmechanismen unabhängiges "Driften" der Genfrequenz zu ermöglichen. Diese Hypothese stützt sich im wesentlichen auf zwei Befunde (CROW 1972):

- Vom molekularen Aufbau der Proteine ist es bekannt, daß einzelne Aminosäuresubstitutionen, die nicht das aktive Zentrum, die determinante Gruppe oder für die Konformation entscheidende Bereiche betreffen, zu keiner effektiven Veränderung funktioneller Eigenschaften führen und somit selektiv neutral sind (im Sinne der oben erwähnten Relation zur Populationsgröße).
- Homologe Proteine verschiedener Spezies (Hämoglobin, Cytochrom c) zeigten bei Vergleichen ihrer Aminosäuresequenzen und den Zeitspannen ihrer evolutionären Divergenz, konstante übereinstimmende Mutationsraten . Bei Kenntnis der Mutationsrate und der Zahl der Aminosäuresubstitutionen läßt sich die Entwicklung verschiedener Spezies aus gemeinsamen Verfahren zurückverfolgen und ein Stammbaum darstellen (KIMURA und OHTA 1971). Das spricht dafür, daß in der Evolution der Proteine auf Grund selektiver Neutralität Mutationsrate und Zufallsdrift (die zur Fixation führt) eine wesentliche Rolle spielen.

Die Rate solcher Genaubstitutionen (d.h. Verdrängung eines Allels durch eine selektiv neutrale Mutante) ist abhängig von der Mutationsrate (u) für neutrale Allele am entsprechenden Genort. Jede neue Substitution beginnt und endet nach 1/u Generationen. KIMURA und OHTA (1971) berechneten die Zeitspanne bis zur Fixation eines Allels in Abhängigkeit von der Populationsgröße:

$$t = 4 N_e$$

Wenn nun die Populationsgröße so ist, daß der Wert $4 N_e$ gleich oder größer als 1/u ist, werden über soviele Zeiträume der Evolution zwei oder mehr Allele nebeneinander in der Population vorhanden sein. Es besteht Polymorphismus. Abbildung 3 zeigt die Verdrängung eines Allels durch ein mutantes. Bei sehr kleiner Populationsgröße bzw. sehr niedriger Mutationsrate ( $4 N_e$ kleiner als 1/u) wird das entsprechende Gen während seiner Evolution vorwiegend nicht polymorph sein. Tat die Bedingung $4N_e = 1/u$ annähernd erfüllt, gilt das eben gesagte. Wenn $4N_e$ größer als 1/u sein sollte (in der Abbildung 3 $4N_e = 2,3/u$), werden über bestimmte Zeitspanne drei Allele nebeneinander vorkommen. Die Abb. 3 enthält natürlich nur den kleinen Teil der neutralen Mutanten, der die Chance hat, in der Population fixiert zu werden. Die Darstellung als Risk-Fisk-Linie soll verdeutlichen, daß es große Zufallsschwankungen auf diesem Wege gibt, und daß die einzelnen Substitutionen eventuell mehrere hintereinander auftreten können.

Der Anteil der Heterozygoten an Genorten, an die genetische Drift wirkt, beträgt nach KIMURA (1968):

$$1 - F = \frac{4 N_e u}{4 N_e u + 1}$$

Das bedeutet, daß unter Anwendung der Hypothese (1) Zufallsdrift und bei Annahme einer Konstanz der effek-

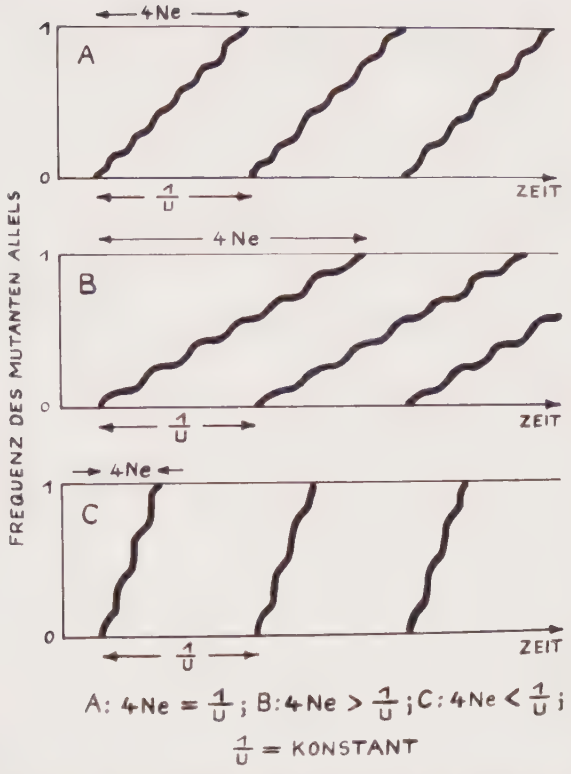


Abb. 3: Verdrängung eines präexistierenden von einem mutanten Allel durch genetische Zufallsdrift (modifiziert nach CROW 1972)

tiven Populationsgröße, die Heterozygotenhäufigkeit verschiedener Loci eine Funktion der Mutationsraten für neutrale Allele ist. Je größer die Mutationsrate, desto größer die Heterozygotie (HARRIS 1975).

In den letzten Jahren wurden eine Reihe von statistischen Tests entwickelt, um aus der Heterozygotenhäufigkeit auf die selektive Neutralität polymorpher Allele in humanen und anderen Populationen zu schliessen (NEVO 1973, EWENS und FELDMAN 1974, MARYAMA und KIMURA 1974, YAMAZAKI 1974). LEWONTIN und KRAKAUER (1973) veröffentlichten ein Prüfverfahren, dem folgende Überlegung zu Grunde liegt: Während die Selektion differenziert an jedem Genort und Allel angreift, äußert sich die Driftwirkung zufällig. Die Autoren vergleichen die Varianz der Allelfrequenzen polymorpher Genorte bei Subpopulationen einer einzigen Spezies mit

Erwartungswerten, die unter der Annahme, daß nur die genetische Drift wirkt, berechnet wurden. Die Anwendung des Verfahrens auf die polymorphen Blutgruppen-Genorte ergab signifikante Differenzen, d.h. selektive Differenzen zwischen den einzelnen Allelen.

Abschließend seien die Hypothesen zur Entstehung des genetischen Polymorphismus noch einmal zusammengefaßt:

a) Polymorphismus im genetischen Gleichgewicht, entstehend durch balancierende Selektion wie z.B. Überdominanz, häufigkeitsabhängige Selektion.

b) Polymorphismus im genetischen Ungleichgewicht, transienter Polymorphismus (wegen der kleinen Untersuchungszeiträume im Vergleich zu denen der Evolution werden Quasi-Gleichgewichtsbedingungen gefunden)

Ursache I : Verdrängung eines präexistierenden Allels durch ein mutantes, vorteilhaftes Allel (Selektion).

Ursache II: Verdrängung eines präexistierenden Allels durch ein mutantes, neutrales Allel (genetische Zufallsdrift).

Eine Gesamttheorie der Evolution wird determinierende und zufällige Faktoren einschließen müssen. Es ist deswegen nicht unwahrscheinlich, daß in diesem Sinne alle drei Hypothesen ( a, $b_I$, $b_{II}$) richtig sind. Nur im konkreten Einzelfall stehen sie sich als Alternativen gegenüber.

Die "Neutralitätstheorie" hat viel zur theoretischen Klärung beigetragen, weil sie in der Lage ist, konkrete, mathematische Aussagen zu machen, deren Übereinstimmung mit experimentellen und Beobachtungsdaten statistisch geprüft werden kann ([illegible]).

## 1.4 DIE MEDIZINISCHE BEDEUTUNG HÄUFIGER UND SELTENER GENETISCHER ISOENZYM - VARIANTEN

Eine gesicherte kausale Beziehung zwischen dem Vorliegen genetisch bedingter Enzymvarianten und dem Auftreten pathologischer Erscheinungen bei deren Trägern ist für die Defektallele nachgewiesen.

Bei einer Reihe von Enzymgenorten kommen mit unterschiedlicher Häufigkeit Allele vor, die keine oder die Synthese eines inaktiven Proteins zur Folge haben. Wenn dem Organismus für die Synthese des Enzymproteins nur ein Genort zur Verfügung steht, führt der Mangel dieses Enzyms zur Verschiebung des Fließgleichgewichtes im Intermediärstoffwechsel. Der entsprechende Reaktionsschritt wird gehemmt, es kommt zum Substratanstau an den vorgeschalteten Reaktionen und zur Verlangsamung des Umsatzes in der gesamten Stoffwechselkette. Zum Teil werden die angestauten Substrate auf Nebenwegen, die im gesunden Organismus nicht nachweisbar sind, verstoffwechselt (siehe Abb. 4). Diese Reaktionsprodukte und/oder die angestauten Substrate stellen in der Regel die unmittelbar krankmachenden Noxen dar.

Diesen zwangsläufigen Mechanismus der Wirkung mutanter Gene auf den Stoffwechsel vermutete schon GARROD (1908), als er die Hypothese über die "inborn errors of metabolism" aufstellte. Alle Prozesse der Transkription und Translation laufen im Organismus der Defektträger mit derselben Präzision ab wie beim Gesunden. Die vom aberranten Genotyp gesteuerte Phänogenese wird aber hier zur Pathogenese der Erbkrankheit (WEICKER 1973). Die Tabelle 4 zeigt für eine Reihe von Stoffwechselerkrankungen die Häufigkeit des Auftretens homozygoter Träger solcher Defektallele.

Am Beispiel der Galaktose-1-Phosphat-Uridyltransferase sei die klinische Bedeutung des Enzymmangels kurz erläutert. 1908 beschrieb FEUSS erstmalig

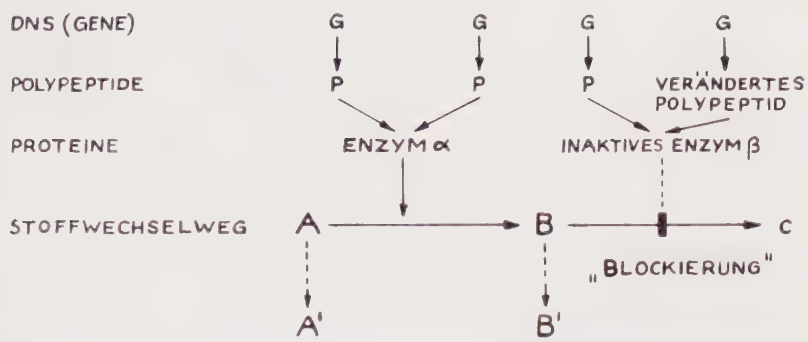


Abb. 4: Schema eines genetischen Stoffwechselblocks (nach FUHRMANN 1971)

A, B: angestaute Substrate des Stoffwechselweges

C : als Folge der Blockierung gesenkte Konzentration des Stoffwechselendproduktes

A',B': Produkte pathologischer Stoffwechselnebenwege

das klinische Bild der Galactosämie. KOMROWER et al. (1956) wiesen nach, daß die Galactose-1-Phosphat-Konzentration in den Erythrocyten galactosämischer Patienten stark erhöht ist, und schlußfolgerten daraus, daß ein Block der Umwandlung von Gal-1-P in Gluc-1-P vorliegen muß. KALCKAR et al. (1956) gelang kurz darauf der Beweis dieser Hypothese. Sie fanden in den Erythrocyten Kranker keine Uridyltransferase-Aktivität. Durch den immunologischen Nachweis des Enzymproteins wurde gesichert, daß es sich um eine Mutation am Strukturgen und nicht am Regulatorgen oder Operatorgen handelt (TEDESCO und MELLMAN 1971, TEDESCO 1972). Familienuntersuchungen zeigten die Rezessivität des Allels. Neben dem Defektallel wurde am UT-Genort ein häufiges Allel gefunden (Allel 2, Duarte-Variante), das die Synthese eines um 50 % weniger aktiven Enzyms mit veränderter elektrophoretischer Beweglichkeit steuert (BEUTLER et al. 1965). Dieser Enzympolymorphismus wurde inzwischen

in vielen Populationen untersucht und bestätigt ([illegible]MAN et al. 1968, MATHAI und BEUTLER 1966, BEUTLER et al. 1966, BISSBORT und KÖMPF 1972, 1978, [illegible] MARTIN und KIENZLER 1975).

Die scheinbar oft unbegreiflichen Phänomene beim Galactosämie Gene wurde durch die Entdeckung mehrerer seltener Allele aufgeklärt, die die Synthese von Enzymvarianten mit unterschiedlicher Stabilität verursachen: Rennes-, Indiana-, Los Angeles- und Negro-Variante (SCHAPIRA und KAPLAN [illegible], CHACKO et al. 1971, NG et al. 1973, MATZ et al. 1975).

Die Aufklärung vieler Erbkrankheiten als genetisch bedingte Stoffwechseldefekte hat unter anderem dazu geführt, daß

- genaue Methoden für die Diagnostik solcher Krankheiten entwickelt wurden
- die Identifikation von symptomlosen heterozygoten Merkmalsträgern möglich gemacht wurde und
- Verfahren zur pränatalen Diagnostik am Fetus ausgearbeitet werden konnten ( HARRIS 1975 ).

Dadurch wurde der Grundstein für eine umfassende individuelle Ehe- und Familienberatung genetisch [illegible] gelegt, die es ermöglicht, das Erkrankungsrisiko eventueller Kinder exakt einzuschätzen([illegible]).

In vielen Fällen konnte das Vorhandensein eines oder mehrerer aberranter Strukturgene als Ursache einer Erkrankung nachgewiesen werden. Beim überwiegenden Teil häufiger und seltener Allele gibt es dagegen keine Hinweise auf deren Auswirkungen im Intermediärstoffwechsel. Deswegen sind die meisten polymorphen Enzyme für klinische Fragestellungen von untergeordneter Bedeutung.

Für die Labordiagnostik spielen sie aber dagegen eine wichtige Rolle, weil sie eine der Ursachen für die biologisch bedingten Veränderungen der klinisch-chemischen Normwerte darstellen ([illegible] der Indivi-

dualität), deren Kenntnis erst eine sinnvolle Interpretation sogenannter pathologischer Laborwerte gestattet.

Tabelle 4: Durchschnittliche Häufigkeit einiger autosomal-rezessiver Stoffwechselerkrankungen in europäischen Populationen (nach SCHMID-RÜTER 1973)

| Erkrankung | Häufigkeit |
|---|---|
| Phenylketonurie | 1 : [illegible] |
| Histidinämie | 1 : [illegible] |
| Galactosämie | 1 : [illegible] |
| Ahornsirupkrankheit, Homocystinurie | 1 : 300 000 bis |
| Tyrosinose | 1 : 400 000 |

## 1.5 DIE BEDEUTUNG DES GENETISCHEN POLYMORPHISMUS IN DER FORENSISCHEN MEDIZIN

HARRISON und HARRIS (1971) schätzen, daß jeder Mensch an ungefähr 10 % aller Genorte, die die Synthese von Proteinen steuern, für häufige Allele heterozygot ist. Dazu kommt die Vielzahl von seltenen Allelen, die an jedem Genort vorkommen kann. Berücksichtigt man, daß es viele Tausende von Genorten zur Steuerung der Synthese der verschiedenen Proteine geben muß, scheint es sehr wahrscheinlich, daß jedes beliebige Individuum für eine bestimmte Zahl seltener Allele heterozygot ist. Gleichzeitig ist es sehr unwahrscheinlich, daß irgendein zweites Individuum genau die gleiche Allelzusammensetzung haben sollte.

Durch die Untersuchung genetischer Merkmale ist es möglich, eine Population in genotypische Gruppen einzuteilen. Je mehr Merkmale untersucht werden, desto größer wird die Anzahl dieser Gruppen sein. Ihre relative Häufigkeit nimmt entsprechend immer mehr ab (KITTNER und MEHNER 1975). Bei einer theoretisch denkbaren Untersuchung aller möglichen Marker würde die Anzahl der möglichen Genkombinationen (Gruppen) weit über der Zahl der Individuen in der Population liegen. Das bedeutet, daß nicht jede mögliche Konstellation tatsächlich vorkommt und daß jede gefundene Konstellation mit großer Wahrscheinlichkeit nur einmal vorkommt. So bildet der biochemische Polymorphismus zusammen mit den seltenen genetischen Varianten die Grundlage für die sogenannte "Biochemische Individualität".

Von dieser wiederum leiten sich die Anwendungsmöglichkeiten polymorpher Merkmale für Vaterschaftsbegutachtung, Spurenkunde und Identifikation von Personen in der forensischen Medizin ab.

Voraussetzung für die Anwendung eines geneti-

Tabelle 5: Chromosomenlokalisation von Isoenzymgenorten
(modifiziert nach SHOWS und [illegible] 1973)
w = wahrscheinliche Lokalisation

| Genort | Chromosom | |
|---|---|---|
| GEP | 2 | w |
| Adeninphosphoribosyltransferase | 16 | w |
| Adenosindesaminase (ADA) | 20 | w |
| Amylasen | 1 | |
| Citratsynthetase | 12 | w |
| Esterase $A_4$ | 11 | |
| Fumarase | 1 | |
| Ut | 2 | w |
| Alpha-Galactosidase | X | w |
| G-6-PD | X | |
| GOT-C (cytoplasmatisch) | 10 | w |
| Hexosaminidase-A | 7 | |
| Hexosaminidase-B | 5 | w |
| Hexokinase (Fibroblasten) | 10 | w |
| Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase | X | |
| Indophenoloxidase-A | 21 | |
| Indophenoloxidase-B | 6 | |
| ICDH (cytoplasmatisch) | 2 | |
| LDH-A | 11 | |
| LDH-B | 12 | |
| MDH (cytoplasmatisch) | 2 | |
| Malatenzym (cytoplasmatisch) | 6 | |
| Mannosephosphatisomerase | 7 | w |
| Nucleosidphosphorylase | 14 | |
| Ppetidase-A | 18 | |
| Peptidase-B | 12 | |
| Peptidase-C | 1 | |
| $PGM_1$ | 1 | |
| $PGM_2$ | 6 | w |
| 6-PGDH | 1 | |
| Phosphoglyceratkinase | X | |

Tabelle 5: Fortsetzung

| | | |
|---|---|---|
| Glucosephosphatisomerase | 19 | |
| Enolase | 1 | w |
| Pyruvatkinase-3 | 7 | w |
| Triosephosphatisomerase | 12 | w |
| Thymidinkinase | 17 | |
| UDPG-Pyrophosphorylase | 1 | w |

BCHEN Merkmale in Paternitätsgutachten sind: Kodominanter Erbgang, zuverlässige Bestimmungsmethode und ein unveränderliches Merkmal (PROKOP und UHLENBRUCK 1969). Die meisten Enzympolymorphismen werden autosomal, einige auch X-chromosomal vererbt. Die Tabelle 6 gibt eine Übersicht über bisher bekannte Lokalisationen von Isoenzymgenorten auf Autosomen und X-Chromosom.

Der Erbgang ist in der Regel kombinant. Das heißt, die elektrophoretische Auftrennung der Isoenzyme erlaubt, die Genotypen direkt zu erkennen. Eine Ausnahme bilden die heterozygoten Träger eines Defektallels, deren Phänotyp im Elektrophoregramm dem des homozygoten "Wildtyps" entspricht (siehe "Die Möglichkeiten zur Trennung von Isoenzymen").

Wenn das entsprechende Enzymsystem kombinant und unabhängig von anderen Merkmalsystemen vererbt wird (keine oder nur geringe Kopplung), liegt ein System mit vollständiger Verwendbarkeit für den Vaterschaftsausschluß vor (HIRSZFELD 1960). Das bedeutet, daß das System nur direkte Ausschlüsse ermöglicht. Demgegenüber enthalten Systeme mit unvollständiger Verwendbarkeit (dominant-rezessiver Erbgang) mögliche und direkte Ausschlüsse (RITTNER und WEHNER 1975).

Bei der Begutachtung der Vaterschaft eines Trägen X stehen sich zwei alternative Aussagen gegenüber:

- Zeuge X kann Vater sein.
- Zeuge X kann nicht Vater sein.

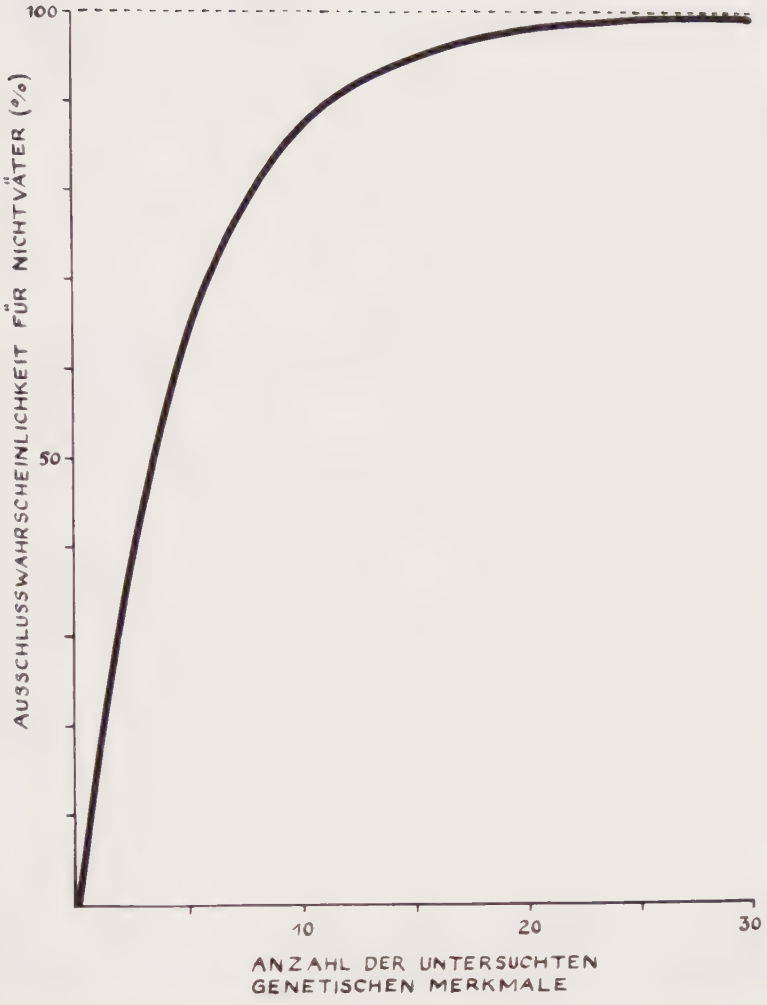


Abb. 5: Ausschlußwahrscheinlichkeit für Nichtväter bei Verwendung mehrerer diallele Merkmale

Die Abbildung 6 verdeutlicht diesen Sachverhalt, wobei die Kurve die maximale Ausschlußwahrscheinlichkeit für alle untersuchten Merkmalskombinationen angibt. In der Praxis ist jedoch die Bedingung $p = q = 0,5$ meist nicht erfüllt, so daß die tatsächlichen Werte innerhalb der Fläche unter der Kurve liegen. Weiterhin wird deutlich, daß der Gewinn an Ausschlußwahrscheinlichkeit durch Hinzunahme eines neuen Systems mit steigender Gesamtzahl der untersuchten Marker immer kleiner wird. Dieser Gewinn hängt also neben den Genfrequenzen auch von der Zahl und Qualität der bereits untersuchten Merkmale ab.

# 2. ESTERASE & ISOENZYME BEIM MENSCHEN

## 2.1 DIE MENSCHLICHEN CARBOXYLESTERASEN UND ISOENZYME

Der Einteilung der "Commission on Enzymes" der IUB (1961) folgend gehören esterspaltende Enzyme in die Klasse der Hydrolasen. Entsprechend dem hauptsächlich gespaltenen Substrat erfolgt die Untergliederung der Esterasen, wie sie in Tabelle 6 dargestellt ist. In

Tabelle 6: Klassifikation der esterspaltenden Hydrolasen (Report of the Commission on Enzymes of the IUB 1961)

| Index | Enzym |
|---|---|
| EC 1.-.-.- | Oxidoreduktasen |
| EC 2.-.-.- | Transferasen |
| EC 3.-.-.- | Hydrolasen |
| 3.1. | Esterbindungen spaltend |
| 3.1.1. | Carboxylesterasen |
| 3.1.2. | Thiolesterhydrolasen |
| 3.1.3. | Phosphorsäuremonoesterhydrolasen |
| 3.1.4. | Phosphorsäurediesterhydrolasen |
| 3.1.5. | Phosphorsäuretriesterhydrolasen |
| 3.1.6. | Schwefelsäureesterhydrolasen |
| EC 4.-.-.- | Lyasen |
| EC 5.-.-.- | Isomerasen |
| EC 6.-.-.- | Ligasen (Synthetasen) |

Esterasen nur die Enzyme bezeichnet, die die hydrolytische Spaltung von Estern kurzkettiger Carbonsäuren katalysieren. Diese Spaltung von Carboxylestern ver-

läuft nach folgendem, allgemeinem Reaktionsmechanismus:

Nach Lösung der Esterbindung entstehen Alkohol und Carbonsäure wird eine intermediäre Acylenzymverbindung aufgebaut. Im zweiten Reaktionsschritt wird der Säurerest auf einen Acyl-Akzeptor übertragen, unter normalen physiologischen Bedingungen meist Wasser. In vitro besteht auch die Möglichkeit, daß ein zweiter Alkohol als Acyl-Akzeptor fungiert. Die Carbacylesterasen können unter solchen Bedingungen gleichzeitig Acyltransferasen (MYERS 1960).

Die bereits genannte Klassifikation der IUB führt auch für die Gruppe der "Esterasen in engerem Sinne" eine Einteilung nach der Art der hydrolysierten Esterverbindung ein, die aber aus folgendem Grund nicht befriedigen kann: Eine absolute Substratspezifität der Esterasen gibt es nicht. Bestenfalls existieren mehr oder weniger deutliche quantitative Unterschiede der Substrataffinität verschiedener Enzyme. In der Vergangenheit wurden ihrer scheinbaren Substratspezifität wegen zahlreiche Esterasen beschrieben, die die Arzneiverbindungen pharmakologisch wirksamer und anderer Alkohole in menschlichen Organismus spalten. Durch die eingehende biochemische Untersuchung konnte bei den meisten dieser postulierten "spezifischen Esterasen" nachgewiesen werden, daß es sich um ein und dasselbe Enzym bzw. um eine Gruppe von wenigen Enzymproteinen handelt, die in der Lage sind, eine Vielzahl verschiedener Ester zu spalten.

PILZ (1970) teilt unter diesen Gesichtspunkten die Esterasen in vier große Gruppen ein: 1. Acylesterasen oder unspezifische Carbacylesterasen, 2. Lipasen, 3. Cholinesterasen und 4. Phosphatasen.

Vergleichende Untersuchungen von Esterasen und anderen hydrolytisch spaltenden Enzymen zeigten, daß zum Teil große Ähnlichkeiten bestehen. So spaltet die proteolytischen Enzyme Trypsin, Chymotrypsin und Subtilin

ebenfalls Carboxylester nach dem gleichen Katalyse-mechanismus und werden wie die Esterasen durch Diiso-propylfluorophosphat (DFP) und Diäthyl-p-nitrophenyl-phosphat (Paraoxon oder E 600) gehemmt. Andererseits zeigen einige Esterasen auch die Fähigkeit, Amide, Säure-anhydride und Phosphorsäurearylester zu spalten (MYERS 1960).

Die Fähigkeit, Esterverbindungen zu spalten, scheint also eine bei vielen hydrolysierenden Enzymen verbreitete Eigenschaft zu sein. Möglicherweise stellt das eine "Mehrfachsicherung" dieser für den Organismus wichtigen Reaktion (Entgiftung, Lipidstoffwechsel, Erregungsübertragung) gegen den Ausfall eines oder mehrerer Enzymproteine durch das Auftreten von Defekt-allelen dar. Die physiologische Bedeutung einzelner esterspaltender Enzyme ist aber gerade wegen der so wenig ausgeprägten Substratspezifität schwer zu ermitteln, weil die in vitro zur Messung der Enzymaktivität verwendeten Substrate durchaus nicht den in vivo vorhandenen entsprechen müssen.

Eine gewisse Ausnahme bildet hierbei die Acetyl-cholinesterase. Zusammen mit der Cholinacetylase regelt die zelluläre Acetylcholinesterase die Acetylcholin-Konzentration an cholinergen Synapsen ([illegible] 1962).

Cholin + Acetyl-CoA → Acetylcholin $\xrightarrow{H_2O}$ Cholin + Essigsäure

(Acetyl-CoA → Acetylcholin: Cholinacetylase; Acetylcholin → Cholin + Essigsäure: Acetylcholinesterase)

Die erythrocytäre Acetylcholinesterase zeigt eine relative Spezifität bezüglich des Säurerestes im zu spaltenden Ester (Acetylcholin und andere Essigsäureester[illegible]).

Die im Serum vorhandene und in der Leber synthetisierte Cholinesterase wird entsprechend ihrer größeren Unspezifität mit verschiedenen Namen bezeichnet wie Pseudocholinesterase, s-Typ-Cholinesterase, unspezifi-

Esterase, Tributyrinase, Procainesterase, Aspirinesterase u.a. . In jedem Fall handelt es sich um dasselbe Enzymprotein, dessen Aktivität nur mit verschiedenen Substraten gemessen wurde (RICHTERICH 1973).

Wegen der geringen Substratspezifität hat es sich allgemein durchgesetzt, bei der Besprechung esterspaltender Enzyme stets das zur Messung der Aktivität verwendete Substrat anzugeben, um Verwechslungen zu vermeiden.

Wenn im weiteren Text von den Esterasen und ihren Isoenzymen gesprochen wird, so sind damit die Enzymaktivitäten gemeint, die nach Auftrennung mit der Zonenelektrophorese und unter Verwendung der Diazotechnik (mit Naphtylestern) oder mit Hilfe von Estern des fluorogenen Substrates 4-Methyl-Umbelliferon nachgewiesen wurden (COATES et al. 1975). Mit dieser Technik werden drei Gruppen von Isoenzymen in menschlichen Zellen gefunden:

- Acetylcholinesterase:
  Sie ist membrangebunden. Ihr Nachweis erfordert eine spezielle Präparationstechnik. In einfachen Hämolysaten ist sie deswegen nicht nachweisbar (TASHIAN 1969).
- unspezifische Esterasen:
  Isoenzymgruppen A , B , C und D
- Carboanhydrasen:
  Sie werden auf Grund ihrer deutlichen Esteraseaktivität miterfaßt.

TASHIAN (1969) trennte die Esterase-Isoenzyme menschlicher Erythrocyten mit Hilfe der Stärkegelelektrophorese (Boratpuffer, pH = 8,0 ... 8,6) und benutzte zum Nachweis Naphtylester als Substrat (siehe Abbildung 6). Er postulierte für die unspezifischen Esterasen 5 Isoenzymgruppen entsprechend ihrer Substrataffinität und ihrer elektrophoretischen Mobilität ($A_3 < B < A_2 < A_1 < C$). HOPKINSON et al. (1973) fanden bei Einsatz von 4-Methylumbelliferylestern als Substrat zur Anfärbung der Phero-

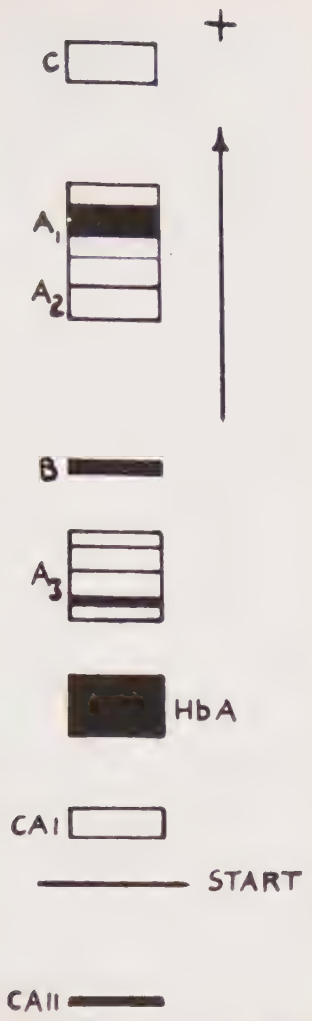


Abb. 6: Stärkegelelektrophoretische Auftrennung der Esterase-Isoenzyme menschlicher Erythrocyten (nach TASHIAN 1969)

grasse neben der von TASHIAN (1969) erhaltenen Befunden eine neue Gruppe von Isoenzymen und nannten sie Esterase D. Gleichzeitig konnten sie einen genetischen Polymorphismus nachweisen, der durch zwei Allele am Esterase-D-Genort gesteuert wird.

Die Abbildung 7 zeigt die elektrophoretische Auftrennung der Esterase-Isoenzyme aus menschlichen Hämolysaten und deren vergleichende Darstellung mit Umbelliferyl- und Naphtylestern (HOPKINSON et al. 1973). Schon dieser Vergleich deutet auf die unterschiedliche Substrataffinität der einzelnen Isoenzyme hin. COATES et al. (1975) untersuchten diese eingehend.

Es reagieren:

- nur mit Umbelliferylestern:
  Esterase D
- mit Umbelliferyl- und Naphtylestern:
  gleich aktiv:
  Esterase $A_2$

Esterase $D_1$
Carboanhydrase $CA_{II}$
aktiver mit Umbelliferylacetat
Carboanhydrase $CA_I$
aktiver mit Naphtylester
Esterase $A_1$
Esterase $A_2$
Cholinesterase (Cholest)
- nur mit Naphtylestern:
Esterase $C_1$

Außerdem liegen Unterschiede der Substratspezifität bezüglich des Säureanteils im Hydrolysierungsgrad vor.

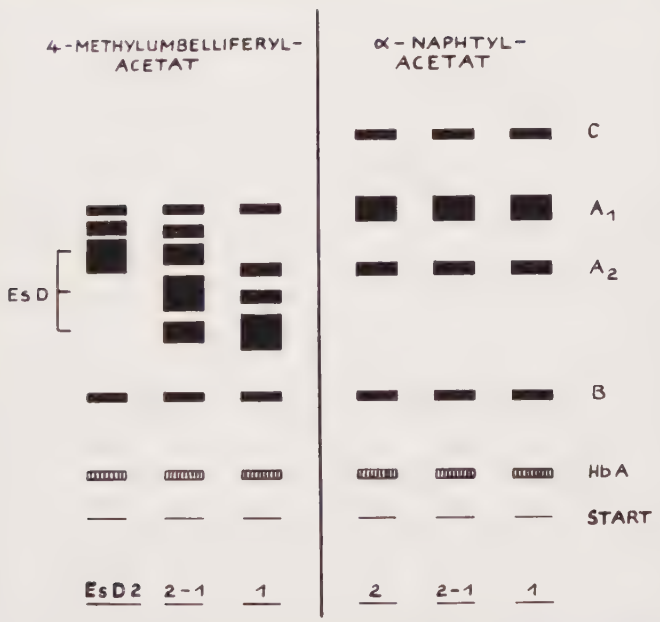


Abb. 7: Stärkegelelektrophoretische Auftrennung der Esterase-Isoenzyme menschlicher Erythrocyten in TRIS-Citrat-Borat-Natriumhydroxid-Puffer, pH = 7,2; und vergleichende Darstellung mit α-Methyl-Umbelliferyl- und Naphtylacetat (nach einer Photogramm-Aufnahme aus HOPKINSON et al. 1972)

Tabelle 7: Genorte und Isoenzyme der menschlichen Esterasen (mod. nach COATES et al. 1975)

| Genort | Isoenzym |
|---|---|
| Es $A_1$ | $A_1$, $A_2$, $A_3$ |
| Es $A_4$ | $A_4$ |
| Es $A_5$ | $A_5$ |
| Es $A_6$ | $A_6$ |
| Es $A_7$ | $A_7$ |
| Es $B_1$ | $B_1$ |
| Es $B_3$ | $B_2$, $B_3$ |
| Es $B_4$ | $B_4$ |
| Es C | C |
| Es D | D |
| $CA_1$ | $CA_I$ |
| $CA_2$ | $CA_{II}$ |

(TASHIAN 1969, HOPKINSON et al. 1973, COATES et al. 1975). Die Isoenzyme, die bevorzugt Acetylester spalten, werden in der Gruppe der A-Esterasen zusammengefaßt. Die C- und D-Esterasen werden wegen ihrer sonstigen Unterschiede (elektrophoretische Mobilität, Spezifität, Hemmbarkeit), obwohl sie ebenfalls bevorzugt Acetylester hydrolysieren, nicht zu den A-Esterasen gezählt. Die hauptsächlich Butyrylester spaltenden Enzyme werden entsprechend als B-Esterasen bezeichnet.

An dieser Stelle zeigt sich wieder, daß wegen der geringen Substratespezifität das ursprüngliche Einteilungsprinzip: A für Acetylesterasen, B für Butyrylesterasen usw. als alleiniges verlassen werden mußte, um durch andere funktionelle und strukturelle Merkmale erweitert zu werden.

Der bisherigen Betrachtung lagen lediglich die Esterase-Isoenzyme der menschlichen Erythrocyten zu Grunde. Untersuchungen von menschlichen Leber-, Muskel-, Gehirn-, Fettgewebs- und Nierenzellen, von Leucocyten, kultivierten Fibroblasten und Lymphocytoidzellen ergaben Elektrophoresemuster, die zusätzlich zu den im Erythrocyten vorhandenen weitere Banden zeigten (Übersicht bei COATES et al. 1975). HOPKINSON et al. (1973) untersuchten die Organverteilung der Esterase-D-Isoenzyme, die in allen Geweben die höchste Aktivität im Vergleich

zu den anderen Esterasen zeigten. COATES et al. (1975) ermittelten die Organverteilung aller Isoenzyme und postulierten die Existenz von 11 Strukturgenorten, die die Synthese von 10 Esterase-Isoenzymgruppen steuern (siehe Tabelle 7).

Die Tabelle 8 gibt eine zusammenfassende Darstellung der Esterasen mit ihren bisher untersuchten funktionellen und strukturellen Eigenschaften und ihrem Vorkommen in den menschlichen Geweben.

Die Aktivitäten der einzelnen Isoenzyme ändern sich während der Ontogenese (COATES et al. 1975). Zum Zeitpunkt der Geburt sind diese Veränderungen jedoch im wesentlichen abgeschlossen. Die $B_2$- und $B_3$-Esterasen zeigen beim Foeten eine sehr niedrige Aktivität, die kurz vor der Geburt ansteigt und beim Neugeborenen schon die endgültige Höhe hat. Die $B_1$-, $B_4$-, $A_4$- und D-Isoenzyme zeigen dagegen keinerlei entwicklungsabhängige Änderung ihrer Aktivität. Die Carboanhydrasen sind in foetalem Gewebe nur unsicher nachweisbar, die $A_3$-, $A_2$- und $A_1$-Isoenzyme überhaupt nicht. Die $A_5$- und $A_6$-Esterasen zeigen dagegen ausgeprägte Entwicklungsabhängigkeit(außer in Gewebe menschlicher Gonaden). Sie sind in foetalen Leber-, Nieren-, Muskel- und Intestinalgewebe deutlich nachweisbar. Ihre Aktivität nimmt aber in der zweiten Hälfte der Gestationsperiode ab, so daß sie bei Neugeborenen nur noch schwache und bei Erwachsenen keine Aktivität mehr zeigen. Im Gehirn liegen die Aktivitäten von $A_5$- und $A_6$-Isoenzymen trotz der gleichgerichteten relativen Abnahme während der Embryonal- und Foetalzeit auch beim Erwachsenen noch sehr hoch.

Die $A_7$-Esterasen sind gerade zu spezifisch für menschliches embryonales Nervengewebe, in allen anderen Geweben sind sie nicht nachweisbar. Ihr Aktivitäts-maximum liegt zwischen 14. und 29. Gestationswoche.

Tabelle 81 Die Esterase-Isoenzyme beim Menschen (MODIFIZIERT nach COATES et al. 1975)
(UAC = 4-Methyl-Umbelliferyl-Acetat; UB = 4-Methyl-Umbelliferyl-Butyrat;
NAC = Naphtyl-Acetat; NB = Naphtyl-Butyrat; FAC = Fluorescein-Acetat;
E 600 = Diäthyl-p-nitrophenylphosphat; Diamox = Acetazolamid; MG = Molekulargewicht, bestimmt durch Gelfiltration mit Sephadex G 200 oder Sepharose 6 B)

| Esterase | Isoenzyme | Substrat | Vorkommen | Inhibierung | MG ($x10^3$) |
|---|---|---|---|---|---|
| Acetylesterasen | $A_1$, $A_2$ | UAC, NAC | Erythrocyten | $HgCl_2$ ($10^{-4}$M) | 80 |
| | $A_2$ | UAC, NAC | Erythrocyten | $HgCl_2$ ($10^{-4}$M) | 40 |
| | $A_3$ | UAC, NAC | ubiquitär, bes. Niere | — | 40 |
| | $A_5$, $A_6$ | UAC, NAC | Genaden, Gehirn beim Fasten | $HgCl_2$ ($10^{-4}$M) | — |
| | $A_7$ | UAC, NAC | foetales Gehirn | — | — |
| | C | NAC | Erythrocyten | — | — |
| | D | UAC | ubiquitär | $HgCl_2$ ($10^{-4}$M) | 55 |
| Butyrylesterasen | $B_1$ | UB, NB | ubiquitär | $HgCl_2$ ($10^{-4}$M) | 370 |
| | $B_2$ | UB, NB | ubiquitär, bes. Leber | E 600 ($10^{-4}$M) | — |
| | $B_3$ | UB, NB | ubiquitär, bes. Leber | NaF ($10^{-2}$M) | — |
| | $B_4$ | UB | ubiquitär | $HgCl_2$ ($10^{-4}$M) | — |

Zur Auftrennung der Esterase-Isoenzyme wird die Elektrophorese genutzt. Als Trägermedien eignen sich Stärkegel, Agarosegel und z. T. Celluloseacetatfolie. Bei Verwendung eines diskontinuierlichen Boratpuffers (pH = 8,0 ... 8,6) nach TASHIAN (1961, 1968) werden alle Isoenzyme als Banden im Pherogramm sichtbar. Ihre eindeutige Trennung voneinander ist aber schwierig, weil sie sehr eng zusammen liegen.

Optimale Trennungen in Kombination mit dem Einsatz verschiedener Substrate zum Nachweis liefert das TRIS-Citrat-Borsäure-Lithiumhydroxid-System (pH = 7,2)(HOPKINSON et al. 1973) und das TRIS-Maleat-System (pH = 7,2)(HOPKINSON et al. 1973, COATES et al. 1975). Allgemein wird die Trennung der Esterase-Isoenzyme mit steigendem pH-Wert besser. Bei sehr niedrigen pH-Werten (8 und weniger) wird ein Teil nicht aufgetrennt. Das erweist sich in besonderen Fällen als Vorteil (siehe "Diskussion").

Für den Nachweis der Enzymbanden wird das gewünschte Trägermaterial (meist Stärkegel) mit dem Reaktionsgemisch, das den zu spaltenden Ester enthält, inkubiert.

Das pH-Optimum liegt für die A-, B-, C-Isoenzyme bei 6,5 und für die D-Isoenzyme bei 5,0 bis 6,5 (HOPKINSON et al. 1973).

Als Substrate wurden neben den Naphtyl- und 4-Methyl-Umbelliferylestern eine Reihe anderer chromogener und fluorogener Substanzen erprobt (COATES et al. 1975). Sie führen im allgemeinen zu schwächeren Enzymaktivitäten. Zum Teil ist es allerdings wegen der im Vergleich zu Naphtyl- und Umbelliferylestern unterschiedlichen Substrataffinität der Isoenzyme möglich, mit ihrer Hilfe einige Esterasen sicherer und einfacher zu identifizieren. So reagieren beide Carboanhydrase-Isoenzyme mit Naphtylestern. 4-Methyl-Umbelliferyl-Acetat wird nur von der Carboanhydrase $CA_I$ und

Fluoreszein-Acetat nur von der Carboanhydrase $CA_{II}$ hydrolysiert (HOPKINSON et al. 1974).

Für die elektrophoretische Auftrennung der Esterase-D-Isoenzyme wird hauptsächlich Stärkegel als Trägermaterial benutzt (HOPKINSON et al. 1973, WELCH und LEE 1974, WELCH 1974, BENDER und FRANK 1974, BERKMANN 1974, GARGASNA et al. 1976). Daneben findet auch Agarosegel Anwendung (KÜHNL et al. 1975, MARTIN und OTT 1975, KÜSTER et al. 1976).

Die meisten Puffer, deren pH um 7 oder niedriger liegt, geben gute Resultate bei der Esterase-D-Trennung (HOPKINSON et al. 1973)

- Zitronensäure-Phosphat-Puffer (pH = 5,9)
- TRIS-Zitronensäure-Puffer (pH = 7,0)
- Phosphatpuffer (pH = 6,5)
- TRIS-Maleinsäure-Puffer (pH = 7,5)

Als Substrat eignet sich nur 4-Methyl-Umbelliferyl-Acetat. Bei Verwendung von Naphtylestern und Estern anderer chromogener und fluorogener Substanzen (Übersicht bei COATES et al. 1975) ist keine Esterase-D-Aktivität nachweisbar. Abbildung 8 zeigt schematisch

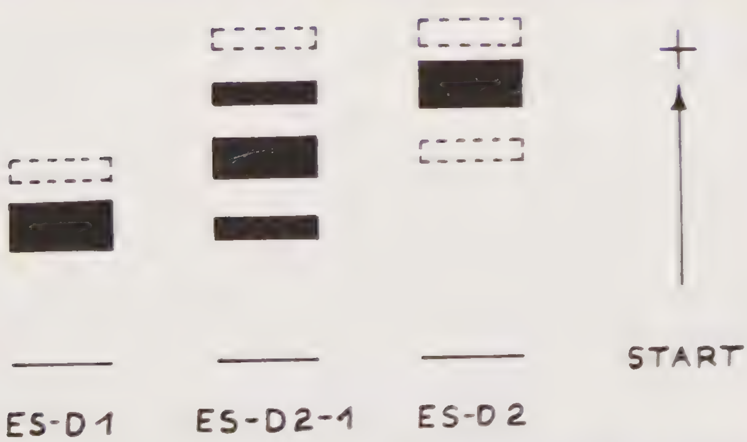


Abb. 8: Die Esterase-D-Typen menschlicher Erythrocyten nach elektrophoretischer Auftrennung im Stärkegel (TRIS-Zitronensäure-Puffer, pH = 6,2)

Die Auftrennung der Esterase D aus menschlichen Hämolysaten mit der Stärkegelelektrophorese. Der heterozygote Typ Es D 2-1 wird durch drei Banden repräsentiert. z. T. ist noch eine schwache 4. Bande anodenwärts vorhanden. Die homozygoten Typen Es D 1 und Es D 2 weisen meist eine intensive und eine schneller wandernde schwache Bande auf. Das eigentliche Produkt des Genortes Es D ist jeweils der langsamer wandernden, intensiveren Bande zuzuordnen. Die schnellere und schwächere 2. Bande (bzw. beim heterozygoten Typ 3. Bande) ist wahrscheinlich das Ergebnis der Bildung sekundärer Isoenzymformen (multipler Enzymformen) im Organismus. Bei längerer Inkubationszeit kommt noch die Überlagerung durch die Bande der $A_2$-Isoenzyme hinzu.

Die Existenz von drei Isoenzymen beim heterozygoten Typ (Bildung eines Hybridmoleküls und zweier homologer Moleküle) spricht zusammen mit der Bildung intermediärer Enzymproteine bei Maus-Mensch-Zellhybriden dafür, daß die Esterase D ein dimeres Proteinmolekül ist (HOPKINSON et al. 1973).

Die von HOPKINSON et al. (1973) durchgeführten Lagerungsversuche zeigten, daß die D-Esterasen relativ stabil sind. Es trat keine Änderung der Aktivität ein nach:

- 20fachem Frieren und Tauen der Hämolysate
- verlängerter Ultraschallhomogenisation
- 18tägiger Lagerung der Hämolysate bei +4°C
- 7tägiger Lagerung der Hämolysate bei -20°C
- 10tägiger Lagerung des ACD-Blutes vor der Herstellung des Hämolysates.

Zusammenfassend seien noch einmal die wesentlichen Charakteristika der Esterase D dargestellt:

- Molekulargewicht: 55 000 (Sephadex G 200)
- Substrat: 4-Methyl-Umbelliferyl-Acetat
- pH-Optimum: 5,0 bis 5,5

- Hemmbarkeit: $HgCl_2$ ($10^{-4}$ Mol/l)
- Gewebeverteilung: ubiquitär
- Entwicklungsabhängigkeit:
  Die Esterase-D-Typen sind bereits beim Foeten vollständig ausgebildet und eindeutig nachweisbar.
- Trennungsmethode:
  Stärkegel- oder Agarosegelelektrophorese.
  Der pH-Wert des Bruckenpuffers sollte möglichst unter 7 liegen.
- Lagerungsstabilität:
  mindestens 15 Tage bei + 4°C (HOPKINSON et al. 1973)
  mindestens 50 Tage bei -20°C (eigene Ergebnisse)

## 2.2 DIE GENETIK DER ESTERASE-ISOENZYME, INSBESONDERE DES ESTERASE-D-POLYMORPHISMUS

Auf Grund ihrer funktionellen und strukturellen Ähnlichkeiten werden die 13 Isoenzymgruppen, die unspezifisch Carbonylester spalten, als Produkte von neun Strukturgenorten angesehen (siehe Tabelle 7, S. 43) (YASHIAN 1969, COATES et al. 1975). Mit Ausnahme der Esterase D wurde bisher keine wesentliche genetisch bedingte Variabilität unter den Esterasen gefunden.

YASHIAN (1969) fand bei Untersuchung von mehr als 4 000 Probanden nur einige sehr seltene $A_1$-Varianten. COATES et al. (1975) stellten bei der Ermittlung der Genotypverteilung der Esterasen an 120 nicht verwandten Personen neben dem Esterase-D-Polymorphismus keine genetischen Varianten fest.

Der Polymorphismus der Esterase-D-Isoenzyme wurde 1973 von HOPKINSON, MESTRINER, CORTNER und HARRIS entdeckt. Er wird von zwei häufigen Allelen in der Population gesteuert, deren mittlere Frequenz in europäoiden Populationen bei

$$Es\ D^1 = 0{,}889 \quad \text{und}$$

$$Es\ D^2 = 0{,}111 \quad \text{liegt.}$$

Außerdem wurde 1974 von BENDER und FRANK ein seltenes Allel ($Es\ D^3$) gefunden.

Die Problematik der Verteilung der Genfrequenzen in verschiedenen Populationen wird im Diskussionsteil der vorliegenden Arbeit näher beleuchtet. Die Tabelle 8 gibt einen Überblick über die Esterase-D-Typen auf der Grundlage der bisher beschriebenen Allele. Da dieses Enzymsystem noch verhältnismäßig "jung" ist, steht zu erwarten, daß mit steigenden Untersuchungszahlen weitere seltene Allele, unter Umständen auch Null-Allele (stumme Gene oder Defektallele) hinzukom-

Tabelle 9: Die Esterase-D-Typen

| Phänotyp | Genotyp | |
|---|---|---|
| Es D 1 | Es $D^1$ / Es $D^1$ | homozygot |
| Es D 2-1 | Es $D^1$ / Es $D^2$ | heterozygot |
| Es D 2 | Es $D^2$ / Es $D^2$ | homozygot |
| Es D 3-1 | Es $D^1$ / Es $D^3$ | heterozygot |
| Es D 3-2* | Es $D^2$ / Es $D^3$ | heterozygot |
| Es D 3* | Es $D^3$ / Es $D^3$ | homozygot |

*bisher nicht beschrieben

nen werden. Abbildung 8 (siehe S. 47) zeigt in Gehen die häufigen Esterase-D-Phänotypen nach Auftrennung mit der Stärkegelelektrophorese.

Die Differenzierung der verschiedenen Esterase-D-Typen beruht allein auf deren unterschiedlicher elektrophoretischer Beweglichkeit. Funktionelle und strukturelle Unterschiede wurden bisher nicht nachgewiesen.

Zusammenfassend sei der Stand der Aufklärung des Esterase-D-Systems kurz dargestellt:

a) Die Genfrequenzen der beiden häufigen Allele (Es $D^1$ und Es $D^2$) wurden in europäiden Populationen durch Typisierung einiger Tausend Individuen sicher bestimmt (s. u.).
Für negride und mongoloide Populationen reichen die bisher durchgeführten kleinen Stichproben nicht aus.

b) Für die Einschätzung der Häufigkeit seltener Allele am Es D - Genort reichen die bisherigen Untersuchungszahlen nicht aus. Insbesondere zur Anwendung des Systems für die Paternitätsbegutachtung muß mit ausreichender Wahrscheinlichkeit, das Vorliegen stummer Gene ausgeschlos-

den werden.

c) Um die Verwendbarkeit des Systems der Esterase D in Paternitätsgutachten beurteilen zu können, sollen weiterhin die Untersuchungen zur Analyse eventueller Kopplungen mit anderen Genorten im Erbgang.

d) Die chromosomale Lokalisation der Es D - Genortes wurde bisher nicht ermittelt. Die Vererbung der Esterase-D-Typen erfolgt unabhängig vom Geschlecht, so daß geschlußfolgert werden kann, daß der Genort auf einem Autosom lokalisiert ist.

# 3. MATERIAL UND METHODEN

## 3.1 DAS UNTERSUCHUNGSMATERIAL

Zur Untersuchung gelangten 329 nichtverwandte Personen (Blutspender) aus Berlin.

Von jedem Spender wurden nach Füllung der Konservenflasche 2 ml des im Abnahmebesteck verbliebenen Blutes in ein separates Röhrchen abgefüllt, das 0,5 ml ACD-AC-Stabilisator enthielt. Die Blutproben wurden nach spätestens 24 Stunden verarbeitet. Bis zur Verarbeitung wurden sie bei + $4^0$C gelagert. Die Arbeitsgänge waren:

- Zentrifugation: Zentrifuge T 23 (Fa. Janetzki) 4 000 RPM, 10 Min.
- Absaugen des Plasmas einschließlich der Leucocytenschicht auf dem Erythrocytensediment (mit der Wasserstrahlpumpe)
- Resuspension des Erythrocytensediments in 0,9 %-iger NaCl-Lösung
- Zentrifugation: s. o.
- Absaugen des Überstandes
- Resuspension des Erythrocytensediments in 0,9 %-iger NaCl-Lösung
- Zentrifugation: s. o.
- Absaugen des Überstandes, ca. 1/3 des Sedimentvolumens an überstehender NaCl-Lösung verbleibt im Röhrchen.

Die Röhrchen wurden anschließend kurz geschüttelt und in eine Kältemischung aus 1 Teil $CaCl_2 * 6 H_2O$ und 4 Teilen Eis (T = $-20^0$C) eingebracht. Nach ungefähr 15 Min. ist der Inhalt fest gefroren. Nun wurden die Proben sofort aus der Kältemischung in eine Tiefkühltruhe gestellt und dort bei $-20^0$C aufbewahrt. Am Tage der elektrophoretischen Auftrennung erfolgte das Auftauen bei Raumtemperatur.

Zum Einbringen der Proben in das Stärkegel wurden die Hämolysate auf Filterpapier (Fa. Schleicher-Schüll, Nr. 2200) aufgenommen, dieses nahezu kräftig ausgedrückt und in das Stärkegel eingebracht.

Die aufgetauten Hämolysate wurden bis zur Ablesung der Elektrophorese am nächsten Tage im Tiefkühlfach eines Kühlschrankes (T = -12°C) aufbewahrt.

## 2.2 DIE ELEKTROPHORETISCHE AUFTRENNUNG

Zur Auftrennung der Esterase-D-Phänotypen wurde die Stärkegelelektrophorese in der Modifikation von RADAM und STRAUCH (1969) durchgeführt. Zur Stromversorgung

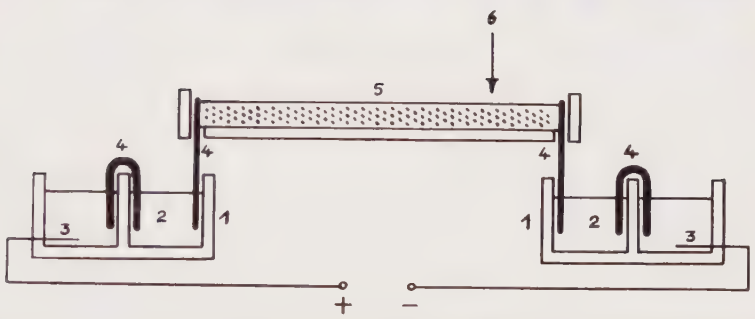


Abb. 9: Schematische Darstellung der Anlage zur Stärkegelelektrophorese (nach RADAM und STRAUCH 1969)
1 = Puffenwanne; 2 = Brückenpuffer; 3 = Platinelektrode; 4 = Filterpapierbrücken (VEB Niederschlag , FN 1); 5 = Stärkegel; 6 = Ort der Probenauftragung

diente das Gerät Statron 301 E. Es wurden die von RADAM und STRAUCH (1969) entwickelten Elektrophorese-Kammern verwendet.

Der TRIS-Zitronensäure-Brückenpuffer (pH = 6,2; siehe Tabelle 10) konnte für 4 Trennungen nacheinander verwendet werden.

Das Trägermaterial bildete 11 %-ige hydrolysierte Kartoffelstärke, die nach folgender Vorschrift aufbereitet wurde:

- Mischung folgender Substanzen:

| | |
|---|---|
| hydrolysierte Kartoffelstärke | 22 g |
| TRIS-Zitronensäure-Puffer 0,1 Mol/l, pH = 8,2 | 15 ml |
| Aqua bidestillata | 185 ml |

- Kurzes Aufkochen der Mischung über dem Bunsenbrenner
- Entfernung der Luftblasen aus dem Sol durch kurzes Anlegen eines Vakuums (Wasserstrahlpumpe)
- Eingießen des blasenfreien, flüssigen Stärkesols in die waagerecht stehende Elektrophoresekammer.

Nach dem Erstarren des Gels und Abkühlen auf Raumtemperatur wurden mit einem schmalen Skalpell ca. 5 mm breite Schnitte im Abstand von 1 cm angebracht und in diese die mit dem Hämolysat durchtränkten Filterpapierstücke eingelegt.

Tabelle 10: Herstellung des Elektrophorese-Brückenpuffers

| Substanz | Molekulargewicht | Menge | Endkonzentration (Mol/l) |
|---|---|---|---|
| Tris(hydroxymethyl)-aminomethan | 121,1 | 12,10 g | 0,100 |
| Zitronensäuremonohydrat | 210,1 | 7,60 g | 0,040 |

Aqua bidestillata ad 1 000 ml; pH = 8,2

Zur Abdeckung des Gels (Schutz vor Austrocknung) diente eine PVC-Folie entsprechender Größe. Die Abbildung 9 gibt die Anordnung der gesamten Anlage schematisch wieder.

Die elektrische Trennung erfolgte bei stabilisiertem Strom [I = 23 mA] über 16 Stunden. Im Laufe der Elektrophorese erhöhte sich dabei die anliegende Spannung von 130 V zu Beginn auf 140 bis 150 V am Ende des Laufes. Während der gesamten Laufzeit befanden sich die Elektrophoresekammern im Kühlschrank, dessen Innenraumtemperatur + 4°C betrug. Bei Verwendung des 0,1molaren TRIS-ZITRONENSÄURE-Puffers (siehe Tabelle 10), dessen relativ niedrige Ionenstärke und damit hoher Widerstand den Stromfluß begrenzt, reichte diese Art der Konvektionskühlung aus, um die entstehende Wärme abzuführen und eine Erhitzung des Stärkegels zu vermeiden.

Neben der Trennung im Stärkegel wurde eine Trennung der Esterase-D-Isoenzyme mit Hilfe von Celluloseacetatfolie als Trägermaterial versucht:

- Celluloseacetatfolie (Fa. Sartorius)
- Brückenpuffer: Phosphat-Zitronensäure-Puffer
  0,01 Mol/l; pH = 6,6
- Spannung: 300 V
- Stromstärke: ca. 5 mA
- Dauer der Auftrennung: 90 Minuten.

## 3.3 DIE ENZYMATISCHE NACHWEISREAKTION

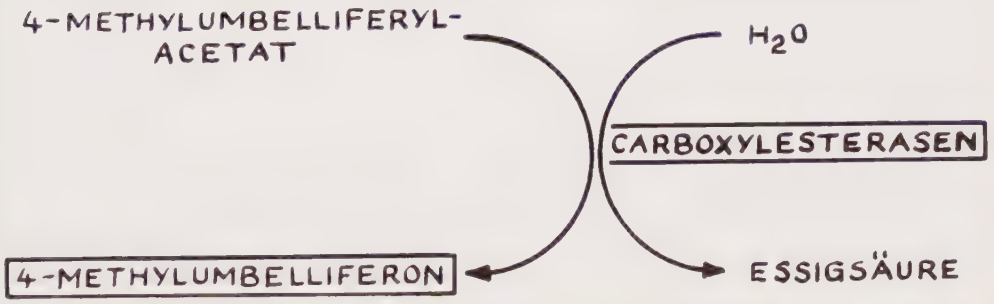


Abb. 10: Die enzymatische Nachweisreaktion zur Lokalisation der Esterase-D-Banden

Nach beendetem elektrophoretischen Lauf wurde die Lage der Isoenzymbanden mit Hilfe einer enzymatischen Farbreaktion bestimmt (siehe Abbildung 10).

Die unspezifischen Esterasen spalten das Substrat 4-Methyl-Umbelliferyl-Acetat in 4-Methyl-Umbelliferon und Essigsäure. Das Umbelliferon zeigt bei Anregung mit ultraviolettem Licht (Wellenlänge um 360 nm) eine intensive, hellblaue Fluorozenz.

Zur Entwicklung eines Pherogrammes wurden 2,5 mg 4-Methyl-Umbelliferyl-Acetat (Molekulargewicht = 218,21) in 2 ml Aceton gelöst und darauf 2 ml Acetatpuffer (0,1 Mol/l; pH = 5,2) zugegeben. In diesem Reaktionsgemisch beträgt die Konzentration des Umbelliferyl-Acetats 2,3 mMol/l.

Zur Darstellung der Enzymbanden wurde ein der Größe des geschnittenen Gels entsprechendes Filterpapier (VEB Niederschlag, FN1) mit der Reaktionslösung getränkt, auf das Gel gelegt und abgedeckt.

Die Ablesung der Phänotypen erfolgt nach fünf- bis zehnminütiger Inkubation bei 37°C.

# 4. ERGEBNISSE

## 4.1 DIE AUFTRENNUNG DER ESTERASE-D-ISOENZYME

Nach fünfstündiger Inkubation des geschnittenen Stärkegels bei 37°C sind die Esterase-D-Banden 2 bis 3 cm anodenwärts vom Startpunkt deutlich sichtbar (siehe Abbildung 11). Die Ablesung der Typen muß innerhalb von 20 Minuten erfolgen, weil die $A_2$-Esterasen sonst die D-Banden überlagern. Die A-Esterasen wandern bei niedrigerem pH (unter 5,5) langsamer (COATES et al. 1975) und liegen nach 15-stündigem Lauf etwa im Bereich

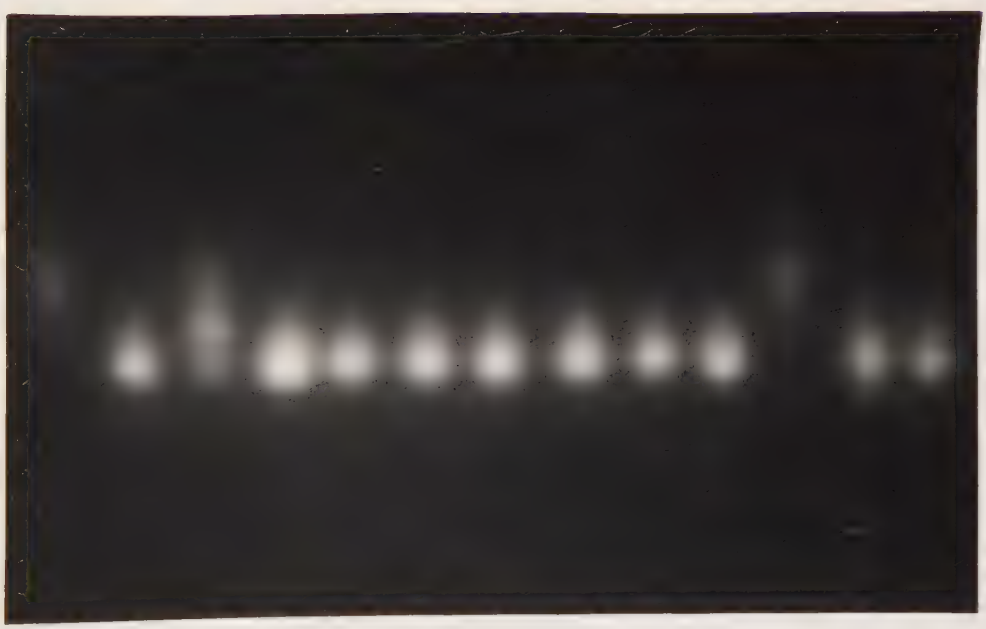

Abb. 11: Stärkegelelektrophoretische Auftrennung der Esterase D aus menschlichen Hämolysaten (NF 20, BLENDE 5.6; 1 sec.; Filter: N/M58 und G2/M58; Entwickler: OSMO 80, 5 min; 20°C)

der D-Esterasen. Wegen ihrer großen Aktivität mit 4-Methyl-Umbelliferyl-Acetat als Substrat erscheinen die Esterase-D-Banden nach wenigen Minuten Inkubation. Bei längerer Inkubationszeit wird aber auch an den Stellen, wo sich A-Esterasen (besonders Esterase $A_2$) befinden, soviel fluorescierendes 4-Methyl-Umbelliferon freigesetzt, daß die Auswertbarkeit der D-Typen beeinträchtigt wird.

Die Auftrennung der Esterase-D-Isoenzyme mit Cellulose-Acetat-Folie (Fa. Sartorius) ergab keine befriedigenden Ergebnisse. Die Auftrennung war schlechter als in Stärkegel (Schleppenbildung), und die nachweisbare Enzymaktivität lag deutlich unter der in Stärkegel. Es war nicht auszuschließen, daß die verwendete Folie trotz 24-stündigem Aufenthalt in verdünntem Brückenpuffer noch denaturierende Substanzen enthielt, die Ursache dieser Aktivitätsverminderung sein könnten.

Die Lagerung der Hämolysate bei -20°C über 60 Tage ergab keine Veränderungen der Enzymaktivität und des Isoenzymmusters.

Bei Lagerung der Hämolysate im Tiefkühlfach eines normalen Kühlschrankes (T = +12°C) über einen Tag hinaus verringerte sich die nachweisbare Aktivität und veränderte sich das Isoenzymmuster in der Elektrophorese.

## 4.2 DIE VERTEILUNG DER ESTERASE-D-PHÄNOTYPEN UNTER DER BEVÖLKERUNG DES BERLINER RAUMES

Bei der Untersuchung von 329 nichtverwandten Personen (Blutspendern) aus dem Berliner Raum wurde folgende Verteilung der Esterase-D-Typen ermittelt (Tabelle 11). Seltene Varianten wurden nicht gefunden.

Tabelle 11: Verteilung der Esterase-D-Phänotypen im Untersuchungsmaterial

| Phänotyp | absolute Häufigkeit | relative Häufigkeit (h) |
|---|---|---|
| Es D 1 | 262 | 0,7964 |
| Es D 2-1 | 66 | 0,2006 |
| Es D 2 | 1 | 0,0030 |
| Summe: | 329 | 1,0000 |

Berechnung der Häufigkeiten der Allele Es $D^1$ und Es $D^2$:

p = Häufigkeit des Allels Es $D^1$

q = Häufigkeit des Allels Es $D^2$

$h_1$ = relative Häufigkeit des Phänotyps Es D 1

$h_{2-1}$ = relative Häufigkeit des Phänotyps Es D 2-1

$h_2$ = relative Häufigkeit des Phänotyps Es D 2

$$p = h_1 + \frac{h_{2-1}}{2} = 0,7964 + \frac{0,2006}{2} = 0,8967 \approx \underline{0,897}$$

$$q = h_2 + \frac{h_{2-1}}{2} = 0,0030 + \frac{0,2006}{2} = 0,1033 \approx \underline{0,103}$$

Der Berechnung liegt zu Grunde, daß der Esterase-D-Polymorphismus näherungsweise als diallelos System aufgefaßt werden kann. Die bisher gefundenen heterozygoten Typen Es D 3-1 kommen so selten vor (BENGTSSON und FRANZ 1974, BARBAGNA et al. 1975, RITTNER und WEBNER 1975), daß eine Vernachlässigung des Allels Es $D^3$, dessen Frequenz in der Größenordnung um 0,1 % geschätzt wird, die Frequenzen der beiden häufigen Allele Es $D^1$ und Es $D^2$ nur unwesentlich verändert.

Die Verteilung der beiden Esterase-D-Allele in der vorliegenden Stichprobe aus dem Berliner Raum beträgt somit:

| | | |
|---|---|---|
| Es $D^1$ | = | 0,897 |
| Es $D^2$ | = | 0,103 |
| Summe | = | 1,000 |

# 5. D I S K U S S I O N

## 5.1 Zur Brauchbarkeit des Esterase-D-Typen

Die isoelektrische Technik (siehe Abschnitt "Material und Methoden") erlaubt eine eindeutige Identifizierung der Phänotypen Es D 1 , Es D 2-1 und Es D 2 .

Die Bilder des Phänotypen zeigen für den heterozygoten Typ Es D 2-1 drei Banden, wobei die mittlere die intensivste ist. Das spricht für die Hypothese von SCHNEIDER et al. (1972), daß die Esterase D ein dimeres Enzym ist. Wie Tabelle 12 zeigt, sind demzufolge im Organismus eines Esterase D 2-1 - Trägers drei Gruppen von Enzymproteinen vorhanden.

Tabelle 12: Unter Annahme der Dimerstruktur der Esterase D im Organismus vorhandene Enzymmoleküle

| Phänotyp | Im Organismus vorhandene Enzymmoleküle | quantitative Verteilung |
|---|---|---|
| Es D 1 | Dimer aus 2 identischen Polypeptidketten des Strukturgens Es $D^1$ | - |
| Es D 2-1 | Dimer aus 2 identischen Polypeptidketten des Strukturgens Es $D^1$ | 1 |
| | Dimer aus einer Polypeptidkette des Es $D^1$ - und einer des Es $D^2$ - Strukturgens (Hybridmolekül) | 2 |
| | Dimer aus 2 identischen Polypeptidketten des Strukturgens Es $D^2$ | 1 |
| Es D 2 | Dimer aus 2 identischen Polypeptidketten des Strukturgens Es $D^2$ | - |

Die zusätzlich auftretenden schwächeren Banden, die bei längerer Inkubationszeit die Esterase-D-Banden zum Teil überlagern, sind durch die Elektrophorese

allein nicht zu identifizieren. Nach den Befunden von HOPKINSON et al. (1973) und COATES et al. (1975) handelt es sich wahrscheinlich um Esterase-A-Banden (siehe Abbildung 7, S. 42). Die Möglichkeit, daß zusätzlich sekundäre Isoenzyme vorliegen, wie z. B. bei der Phosphoglucomutase, ist ebenfalls gegeben (3. bzw. 4. Bande im Pherogramm).

## 7.2 VERGLEICH DER GEFUNDENEN GENOTYPVERTEILUNG MIT DER THEORETISCH ZU ERWARTENDEN HARDY – WEINBERG – VERTEILUNG

In einer unter ungerichteter Partnerwahl im genetischen Gleichgewicht befindlichen Population mit den Allelhäufigkeiten $p$ und $q$, müßten sich die Phänotypen entsprechend der Binomialverteilung $(p + q)^2$ verteilen (Tabelle 13).

Zur Überprüfung der Übereinstimmung der ermittelten Verteilung mit dieser theoretisch zu erwartenden wurde der $\chi^2$ – Test ([illegible] 1967) herangezogen. Die Nullhypothese besagt, daß beide übereinstimmen. Eine Irrtumswahrscheinlichkeit $\alpha$ = 5 % wird vorausgesetzt. Gefundene und theoretische Verteilung stimmen in der Summe ihrer absoluten und relativen Häufigkeiten überein. Weiterhin wurde der Erwartungswert für $p^2n$ aus der Stichprobenverteilung errechnet. Da drei Klassen vorliegen, beträgt die Zahl der Freiheitsgrade somit:

$$f = 3 - 2 = 1 .$$

Der berechnete Wert für $\chi^2$ (Tabelle 14) liegt unter dem Tabellenwert, der bei $f = 1$ und $\alpha$ = 5 % erwartet wird ( $\chi^2_{1;\,0,05}$ = 3,84 ). Das heißt, daß bei

Tabelle 13: Unter Zugrundelegung der gefundenen Genfrequenzen zu erwartende HARDY-WEINBERG-Verteilung

| Phänotyp | relative Häufigkeit | absolute Häufigkeit |
|---|---|---|
| Es D 1 | $p^2$ | $p^2 n$ |
| Es D 2-1 | $2 p q$ | $2 p q n$ |
| Es D 2 | $q^2$ | $q^2 n$ |
| S u m m e | $p^2 + 2pq + q^2 =$ $(p + q)^2 = 1$ | $(p^2 + 2pq + q^2) n =$ $(p + q)^2 n = n$ |
| Es D 1 | 0,8041 | 264,55 |
| Es D 2-1 | 0,1852 | 60,93 |
| Es D 2 | 0,0107 | 3,52 |
| S u m m e | 1,0000 | 329 ,00 |

der vorgegebenen Irrtumswahrscheinlichkeit von 5 % keine signifikanten Differenzen zwischen den Verteilungen festgestellt werden konnten.

Die Nullhypothese kann angenommen werden. Das heißt aber wiederum, daß die berechneten Genfrequenzen für Es $D^1$ und Es $D^2$ mit großer Wahrscheinlichkeit die tatsächliche Verteilung der beiden Allele im Berliner Raum widerspiegeln.

Tabelle 14: $\chi^2$ - Anpassungstest

Irrtumswahrscheinlichkeit $\alpha$ = 5 %
Anzahl der Freiheitsgrade f = 1
$\chi^2_{\alpha;1}$ = 3,84 ; 0,05

$z_i$ = gefundene Häufigkeiten der Phänotypen

$f_i$ = erwartete Häufigkeiten der Phänotypen

| Klasse | $z_i$ | $f_i$ | $D_i$ | $D_i^2$ | $\frac{D_i^2}{f_i}$ |
|---|---|---|---|---|---|
| Kl. 1 | 252 | 254,65 | -2,65 | 6,5025 | 0,0246 |
| Kl. 2-1 | 69 | 66,93 | +5,07 | 25,7049 | 0,4219 |
| Kl. 2 | 1 | 3,42 | -2,42 | 6,3504 | 1,8041 |
| Summe: | 322 | 324,00 | +/- 0 | | $\chi^2$ = 2,2506 |

## 4.3 VERGLEICH DER GEFUNDENEN GENFREQUENZEN MIT DEN BISHER AUS DER LITERATUR BEKANNTEN WERTEN

Der Polymorphismus des Esterase-D-Systems wurde 1973 erstmals von HOPKINSON et al. beschrieben. Seither sind erst zwei Jahre vergangen, und der Umfang der populationsgenetischen Untersuchungen ist noch relativ klein. Lediglich unter europäoiden Populationen beträgt die Gesamtzahl der bisher untersuchten Individuen mehrere Tausend. Untersuchungen bei negroiden und mongoloiden Populationen gehen bisher über den Umfang einiger Hundert Probanden nicht hinaus.

Tabelle 15 faßt die Genfrequenzen anderer Untersucher einschließlich der Ergebnisse dieser Arbeit zusammen. Zur Ermittlung des Unterschiedsgrades wurden jede der bekannten Verteilungen und die eigenen Ergebnisse mit Hilfe des $\chi^2$ - Testes verglichen. Die letzte Zeile der Tabelle 15 gibt die entsprechenden Werte für $\chi^2$ an und weisen aus, ob bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit $\alpha$ = 5 % und zwei Freiheitsgraden Unterschiede nachzuweisen sind.

Dieser Vergleich zeigt, daß signifikante Unterschiede zwischen den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit und den Befunden, die in anderen europäoiden Populationen erhoben wurden, nicht vorliegen. Eine Ausnahme stellt in dieser Hinsicht die Verteilung dar, die von HARBANNA et al. (1975) in der toscanischen Bevölkerung gefunden wurde und eine signifikant höhere Frequenz des Es $D^2$ - Allels ausweist. Weitere Untersuchungen werden zeigen müssen, ob auf den europäischen Kontinent geographisch bedingte Unterschiede der Genvariation im Esterase-D-System tatsächlich vorhanden sind. Einstweilen entspricht die Verteilung, die WELSH und LEE (1974) unter in Großbritannien ansässigen Afrikanern fanden, vollkommen der europäoider Populationen. Ausgehend von dem vermuteten Ursprung

Tabelle 15: Faktoren-D-Genfrequenzen in verschiedenen Populationen (Vergleich mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit)

| Autoren / Population | Es $D^1$ | Es $D^2$ | n | $\chi^2$ | D |
|---|---|---|---|---|---|
| HOPKINSON et al. 1970 | | | | | |
| Europäer | 0,902 | 0,098 | 867 | 2,67 | — |
| Negride | 0,902 | 0,098 | 102 | 2,67 | — |
| Inder | 0,773 | 0,227 | 278 | 58,02 | ++ |
| WELCH und LEE 1974 | | | | | |
| Großbritannien | 0,887 | 0,113 | 399 | 2,48 | — |
| Irland | 0,877 | 0,123 | 186 | 3,85 | — |
| Zigeuner(GB) | 0,896 | 0,105 | 153 | 2,20 | — |
| Lappland | 0,757 | 0,243 | 136 | 71,21 | ++ |
| Kamerun | 0,945 | 0,055 | 92 | 32,96 | ++ |
| Gambia | 0,916 | 0,084 | 734 | 6,13 | ++ |
| Neufundland | 0,890 | 0,110 | 163 | 2,30 | — |
| Nepal | 0,649 | 0,351 | 134 | 195,50 | ++ |
| Papua | 0,935 | 0,065 | 155 | 19,34 | ++ |
| DENKMANN und GOEDDE 1974 | | | | | |
| Deutschland | 0,882 | 0,118 | 408 | 3,05 | — |
| KÜSTER et al. 1975 | | | | | |
| Westdeutschland | 0,883 | 0,117 | 1082 | 2,83 | — |
| BENDER und FRANK 1974* | | | | | |
| Freiburger Raum | 0,889 | 0,111 | 184 | 2,26 | — |
| RITTNER und WEHNER 1975* | | | | | |
| Deutschland | 0,891 | 0,109 | 562 | 2,26 | — |
| KÖHNL et al. 1975 | | | | | |
| Deutschland | 0,888 | 0,112 | 310 | 3,41 | — |
| BARBAGNA et al. 1975* | | | | | |
| Toscana | 0,857 | 0,143 | 499 | 9,26 | ++ |

Tabelle 15: Fortsetzung

| | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| ISHIMOTO et al. 1974 | | | | | |
| Japan | 0,650 | 0,350 | 847 | 164,01 | ** |
| MARTIN und OTT 1975 | | | | | |
| Berlin (West) | 0,884 | 0,116 | 545 | 2,78 | — |
| Vorliegende Arbeit 1975 | | | | | |
| Berlin | 0,897 | 0,103 | 329 | entfällt | |

*Die Frequenz des Allels Es $D^3$ wurde vernachlässigt.
D: signifikante Differenzen ($\alpha$ = 0 %) zu den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit.

der Zigeuner aus Nordwestindien würde man sicher eine höhere Es $D^3$ - Frequenz erwarten. Berücksichtigt man, daß die Zigeuner über Nordafrika nach Europa eingewandert sind - darauf weisen heute noch die Bezeichnungen "Egyptiens" im Französischen und "Gypsies" im Englischen hin - erscheint es möglich, daß Kontakte mit negroiden Populationen einen Zustrom von Es $D^3$ - Allelen in diese Population bewirkt haben könnten.

Alle bisher untersuchten mongoliden Bevölkerungsgruppen zeigten eindeutig niedrigere Es $D^1$ - und höhere Es $D^2$ - Frequenzen (HOFFMEYER et al. 1973, ISHIMOTO et al. 1974, WELCH und LEE 1974). In diese Gruppe gehören auch die Beschrer Lappland. Die Ähnlichkeiten der Genfrequenzen im Esterase- und GPT-Polymorphismus mit denen mongoloider Populationen stimmen mit der Hypothese der Abstammung der Lappen aus Asien und ihrer Einwanderung nach Skandinavien über Osteuropa überein (WELCH und LEE 1974).

Unterschiede lassen sich auch zwischen den Häufigkeiten der Esterase-D-Typen europäoider und negroider Populationen nachweisen. Negroide Bevölkerungsgruppen zeigen höhere Es $D^1$ - Frequenzen. Eine Ausnahme bilden

Tabelle 18: Die Unterschiede in der Häufigkeit heterozygoter Genotypen von Protein- und Blutgruppenpolymorphismen bei verschiedenen Rassen (modifiziert nach NEI und ROYCHOUDHURY 1974)
E: europäoide Populationen, N: negroide Populationen, M: mongoloide Populationen

| Merkmal | E | N | M |
|---|---|---|---|
| **P r o t e i n p o l y m o r p h i s m e n** | | | |
| SEP | 0,542 | 0,373 | 0,319 |
| ADA | 0,095 | 0,058 | 0,060 |
| Adenylatkinase | 0,090 | 0,012 | 0,000 |
| G-6-PD | 0,000 | 0,208 | 0,000 |
| GOT-M (mitochondrial) | 0,018 | 0,079 | --- |
| GOT-C (cytoplasmatisch) | 0,000 | 0,000 | 0,031 |
| GPT | 0,500 | 0,303 | 0,481 |
| Phosphoglucomutase ($PGM_1$) | 0,354 | 0,320 | 0,354 |
| Phosphoglucomutase ($PGM_3$) | 0,385 | 0,449 | 0,309 |
| alkalische Placentephosphatase | 0,514 | 0,193 | 0,420 |
| Esterase $D^+$ | 0,197 | 0,177 | 0,456 |
| **B l u t g r u p p e n p o l y m o r p h i s m e n** | | | |
| ABO | 0,441 | 0,450 | 0,589 |
| Duffy | 0,488 | 0,088 | 0,268 |
| Kell | 0,080 | 0,010 | 0,000 |
| Lewis | 0,363 | 0,498 | 0,491 |
| Lutheran | 0,069 | 0,084 | 0,000 |
| MN | 0,500 | 0,499 | 0,500 |
| P | 0,499 | 0,368 | 0,354 |
| Cc | 0,493 | 0,221 | 0,464 |
| Dd | 0,472 | 0,378 | 0,265 |
| Ee | 0,280 | 0,193 | 0,439 |

+eingefügt, im Material von NEI und ROYCHOUDHURY (1974) nicht vorhanden

hier die Befunde von HOPKINSON et al. (1973), die in einer allerdings sehr kleinen Stichprobe (n = 102) keine Differenzen fanden. Zur Gruppe der Populationen mit größerer Häufigkeit des Ea $D^{u}$ - Gens gehören auch die Papua, die Ureinwohner Australiens.

Ein umfassender Vergleich der drei großen menschlichen Rassen erfordert natürlich, daß möglichst viele genetische Merkmale berücksichtigt werden. Tabelle 16 zeigt einen Teil des von NEI und ROYCHOUDHURY (1974) für einen solchen statistischen Vergleich verwendeten Materials.

Obwohl für die einzelnen Marker große Unterschiede der Variabilität zwischen europiden, negriden und mongoliden Populationen bestehen, ähneln sich die Gesamtheterozygotenhäufigkeiten (Zusammenfassung aller Genorte) bei allen drei Rassen sehr. Für Genorte, die die Synthese von Proteinen steuern, betragen sie einheitlich 10% , für die Blutgruppengenorte 12 % bei Europiden und 10 bis 24 % bei Negriden und Mongoliden.

Die Autoren schlußfolgern daraus, daß die Unterschiede der genetischen Gesamtvariabilität zwischen den Rassen nicht größer als die innerhalb einer Rasse vorhandenen sind. Das deutet darauf hin, daß die drei untersuchten menschlichen Rassen als genetisch voneinander isolierte Populationen anzusehen sind, was sich auch in den zum Teil erheblichen Differenzen der Genverteilung bei einzelnen Genorten widerspiegelt.

Die genetische Gesamtvariabilität und damit das Anpassungsvermögen an wechselnde Selektionsbedingungen stimmen aber bei diesen drei großen Populationen weitgehend überein.

Die Prüfung der Homogenität der Heterozygotie-Genfrequenzen aus den bisher untersuchten europäoiden Populationen (einschließlich der britischen Zigeuner) mit Hilfe der $\chi^2$ - Prüfverteilung zeigt unter Voraussetzung einer Irrtumswahrscheinlichkeit $\alpha$ = 5 % keine signifikanten Abweichungen von den Erwartungswerten. Das errechnete $\chi^2$ ist mehr viel kleiner als der erwartete

Tabelle 17: $\chi^2$-Test zur Prüfung der Homogenität der Genfrequenzen in den europäischen Populationen (einschließlich Brit. Zigeuner)
a) Beobachtungswerte b) Erwartungswerte

| Serie | Es D 1 | Es D 2-1 | Es D 2 | $\sum_{i=1}^{3} \frac{D_i^2}{T_i}$ |
|---|---|---|---|---|
| 1. HOPKINSON et al. (1973) "Europäer" | | | | |
| a | 705 | 154 | 8 | |
| b | 686,54 | 170,80 | 10,66 | 2,868 |
| 2. WELCH und LEE (1974) "Großbritannien" | | | | |
| a | 312 | 84 | 3 | |
| b | 315,49 | 78,60 | 4,91 | 1,153 |
| 3. WELCH und LEE (1974) "Irland" | | | | |
| a | 144 | 38 | 4 | |
| b | 147,07 | 36,64 | 2,29 | 1,391 |
| 4. WELCH und LEE (1974) "Zigeuner, GB" | | | | |
| a | 122 | 30 | 1 | |
| b | 120,98 | 30,14 | 1,88 | 0,422 |
| 5. WELCH und LEE (1974) "Neufundland" | | | | |
| a | 128 | 34 | 1 | |
| b | 128,88 | 32,11 | 2,01 | 0,625 |
| 6. KÖHNE et al. (1975) "Deutschland" (*) | | | | |
| a | 402 | 102 | 6 | |
| b | 403,26 | 100,47 | 6,27 | 0,039 |
| 7. KITTLER und WEHNER (1975) "Deutschland" (+) | | | | |
| a | 446 | 109 | 7 | |
| b | 444,37 | 110,71 | 6,92 | 0,033 |
| 8. KÖHNE et al. (1975) "Westdeutschland" (+) | | | | |
| a | 844 | 223 | 15 | |
| b | 855,64 | 213,15 | 13,31 | 0,826 |
| 9. ZEGERS und FRANK (1974) "Freiburger Raum" | | | | |
| a | 147 | 34 | 3 | |
| b | 145,49 | 36,25 | 2,26 | 0,398 |
| 10. GERMANN und GOEDDE (1974) "Deutschland" | | | | |

Fortsetzung der Tabelle auf Seite 72

Tabelle 17: Fortsetzung

| | | | | |
|---|---|---|---|---|
| 10. BENKMANN und GOEDDE (1974) "Deutschland" | | | | |
| a | 318 | 84 | 6 | |
| b | 322,61 | 80,36 | 5,01 | 0,426 |
| 11. MARTIN und OTT (1975) "Berlin (West)" | | | | |
| a | 428 | 107 | 10 | |
| b | 430,93 | 107,37 | 6,70 | 1,846 |
| 12. Vorliegende Arbeit (1975) "Berlin" | | | | |
| a | 262 | 56 | 4 | |
| b | 260,14 | 64,81 | 4,05 | 2,322 |
| [illegible] | | | | |
| a | 4250 | 1066 | 66 | |
| b | 4260,29 | 1061,44 | 66,27 | $\chi^2$ = 12,186 |

(+) Beobachtungswerte aus Genfrequenzen und Stichprobenumfang berechnet (Absolutzahlen der gefundenen Verteilung standen nicht zur Verfügung).

Tabellenwert für $\alpha$ = 5 % und 22 Freiheitsgrade (siehe Tabelle 17). Die Nullhypothese("Die Populationen stammen in ihrer Genverteilung überein.") kann angenommen werden.

Damit hat auch eine Berechnung "theoretischer" Genfrequenzen für europäische Populationen genügt. Diese betragen

$$\text{Es } D^1 = 0{,}869$$

$$\text{Es } D^2 = 0{,}111 \text{ .}$$

Die anschließende Prüfung auf Differenzen zwischen der mit diesen Frequenzen berechneten [illegible]-Verteilung und der tatsächlich beobachteten mit dem $\chi^2$ - Anpassungstest (siehe Tabelle 18) ergab keine

Tabelle 18: Verteilung der Esterase-D-Phänotypen in europäoiden Populationen

| Phänotypen | Beobachtet | | Erwartet | |
|---|---|---|---|---|
| Es D 1 | 4288 | 0,7903 | 4260,29 | 0,7907 |
| Es D 2-1 | 1065 | 0,1977 | 1061,44 | 0,1970 |
| Es D 2 | 65 | 0,0120 | 66,27 | 0,0123 |
| Summe: | 5388 | 1,0000 | 5388,00 | 1,0000 |

$\chi^2_{\text{berechnet}} = 0{,}037 \qquad \chi^2_{1;\,0{,}05} = 3{,}84$

Genfrequenzen: $Es\ D^1 = 0{,}889$

$Es\ D^2 = 0{,}111$

Signifikanz ( $\alpha$ = 5 % ), so daß auch hier – wie in den der Berechnung zugrunde liegenden Einzelverteilungen – die Nullhypothese (Übereinstimmung von beobachteter und erwarteter Verteilung) angenommen werden konnte.

Tabelle 19 faßt noch einmal in übersichtlicher Form die bisherigen Befunde zur Populationsgenetik der Esterase-D-Isoenzyme zusammen. Die Genfrequenzen und Heterozygotenhäufigkeiten für mongoloide und negroide Populationen werden in der Tabelle als Variationsbreite angegeben, weil sich hier wegen des geringen Stichprobenumfanges eine Zusammenfassung der Daten, wie sie für die europäiden Populationen versucht wurde, verbietet.

Seltene Esterase-D-Varianten wurden bisher von GHOSH und FRANK (1974), RITTNER und WEHNER (1975) und BARGAGNA et al. (1975) beschrieben. Sie fanden je einen Träger der heterozygoten Variante Es D 3-1 in ihren Stichproben. Die auf Grund dieses kleinen Zahlenmaterials erfolgten Schätzungen der Häufigkeit des

Es $D^3$ - Allele ergaben Werte von 0,09 bis 0,27 %. Umfangreichere Untersuchungen werden zur Entdeckungen der Varianten Es D 3-2 und Es D 3 führen und eine genauere Berechnung der Frequenz des Es $D^3$ - Allels ermöglichen.

Die Auffindung einer dieser drei seltenen Varianten, deren Erwartungshäufigkeit nach BARGAGNA et al. (1975) bei 0,2 % für Es D 3-1 , 0,02 % für Es D 3-2 und 0,0004 % für Es D 3 liegen dürfte, war beim Stichprobenumfang der vorliegenden Arbeit (n = 329) nicht zu erwarten.

Tabelle 19: Die Genfrequenzen des Polymorphismus der Esterase D

| | Es $D^1$ | Es $D^2$ | H |
|---|---|---|---|
| Mongoloide Populationen | 0,649 bis 0,773 | 0,351 bis 0,227 | 0,456 bis 0,351 |
| Europäoide Populationen | 0,889 | 0,111 | 0,197 |
| Negroide Populationen | 0,902 bis 0,945 | 0,098 bis 0,055 | 0,177 bis 0,104 |

H = Häufigkeit der heterozygoten Genotypen

## 5.4 DIE VERERBBARKEIT DES ESTERASE-D-POLYMORPHISMUS IM PATERNITÄTSGUTACHTEN

Das Isoenzymsystem der Esterase D wird durch folgende Eigenschaften charakterisiert:

a) Die Synthese der Isoenzyme wird durch einen Genort mit zwei häufigen Allelen gesteuert.

b) Die Vererbung des Esterase-D-Isoenzymmusters erfolgt unabhängig vom Geschlecht. Das läßt darauf schließen, daß sich die DNS des Esterase-D-Locus auf einem Autosom befindet. Die genaue chromosomale Lokalisation des Genortes ist nicht bekannt.

c) Der Erbgang ist kodominant. Aus dem Phänotyp (Muster im Elektrophoresegramm) kann der Genotyp eindeutig identifiziert werden. Es besteht eine 1 : 1 - Beziehung zwischen Phänotyp und Genotyp.
Fehler sind durch das heterozygote Auftreten eines Defektallels (stummes Gen) möglich. Bisher fehlt allerdings ein Hinweis auf das Vorliegen eines solchen am Es D - Locus. Die Größe der bisher untersuchten Stichproben reicht aber noch nicht aus, um das Vorkommen dieser "stummen Gene" mit ausreichender Wahrscheinlichkeit auszuschließen.

d) Die Esterase-D-Phänotypen sind bereits beim Foeten eindeutig nachweisbar. Der Polymorphismus ist deswegen schon bei Neugeborenen und Säuglingen festzustellen und kann entsprechend zum Ausschluß der Vaterschaft eingesetzt werden.

e) Die Typisierung der Esterase-D-Isoenzyme gelingt mittels stärkegelelektrophoretischer Auftrennung und dem Nachweis der Enzymbanden mit dem Essigsäureester des fluoreszierenden Substrates 4-Methyl-Umbelliferon. Die Methode

Tabelle 20: Die Möglichkeiten des Vaterschaftsausschlusses bei gegebener Mutter-Kind-Konstellation

| P H Ä N O T Y P E N | | b e i | |
|---|---|---|---|
| Mutter | Kind | Putativvater | Ausschluß |
| Es D 1 | Es D 1 | Es D 1 | – |
| | | Es D 2-1 | – |
| | | Es D 2 | + |
| | Es D 2-1 | Es D 1 | + |
| | Es | Es D 2-1 | – |
| | | Es D 2 | + |
| Es D 2-1 | Es D 1 | Es D 1 | – |
| | | Es D 2-1 | – |
| | | Es D 2 | + |
| | Es D 2-1 | Es D 1 | – |
| | | Es D 2-1 | – |
| | | Es D 2 | + |
| | Es D 2 | Es D 1 | + |
| | | Es D 2-1 | – |
| | | Es D 2 | – |
| Es D 2 | Es D 2-1 | Es D 1 | – |
| | | Es D 2-1 | – |
| | | Es D 2 | + |
| | Es D 2 | Es D 1 | + |
| | | Es D 2-1 | – |
| | | Es D 2 | – |

–: Ausschluß nicht möglich

+: Ausschluß möglich

ist einfach und sicher. Die enzymatische Nachweisreaktion dauert nur wenige Minuten.

f) Die Esterase D ist relativ lagerungsstabil. Das ermöglicht eine Verschickung und begrenzte Lagerung von Blutproben (im Verhältnis 1 : 4 mit ACD- oder ACD-AG-Stabilisator nach z.B. AS-DOR gemischt) und Hämolysaten (eingefroren bei - 20°C).

g) Bisher konnte für die Esterase-D- Typen keine Beeinflussung durch Ernährung, Krankheit oder andere "Umwelteinflüsse" nachgewiesen werden. Das System kann damit als umweltstabiles, genetisches Merkmal angesehen werden.

Mit diesen Eigenschaften sind eine Reihe von Voraussetzungen gegeben, die PROKOP und UHLENBRUCK (1966) für die Anwendung eines genetischen Merkmalsystems zur Vaterschaftsbegutachtung fordern.

Es fehlen von diesen Voraussetzungen noch ausreichend große Untersuchungen zur exakten Bestimmung der Frequenz seltener Allele, insbesondere "stummer Gene", sowie Analysen zur Ermittlung von Kopplungen mit anderen Genorten im Erbgang.

Unter der Annahme, daß keine enge Kopplung zu anderen Loci nachgewiesen werden kann und daß die Häufigkeit "stummer" Defektallele gegen Null geht, ist das System der Esterase-D-Isoenzyme zum Vaterschaftsausschluß verwendbar. Auf Grund des kombinanten Erbganges besteht in allen Fällen eine eindeutige Beziehung zwischen Phänotyp und Genotyp. Das heißt, daß alle phänotypischen Ausschlußkonstellationen auch genotypisch nur Ausschlüsse enthalten. Es sind direkte Ausschlüsse. Das Isoenzymsystem der Esterase D ist deswegen ein System mit vollständiger Verwendbarkeit (HINZFELD 1960). Tabelle 20 gibt die Möglichkeiten des Ausschlusses der Vaterschaft des Putativvaters bei gegebener Mutter-Kind-Konstellation an. Aus den

Frequenzen der Allele Es $a^1$ ( = 0,097 ] und Es $a^2$ ( = 0,103 ] kann die durchschnittliche Unterscheidungsmöglichkeit für Nichtzwillinge bei alleiniger Anwendung dieses Polymorphismus berechnet werden (HIRSCHFELD 1960):

$$V = p\,q\,(1 - p\,q)$$

$$V = 0{,}094$$

Die durchschnittliche Verwendbarkeit beträgt somit im Berliner Raum 9,4 % gegenüber dem maximal für diallele Syteme von 18,75 % .

Zur Beurteilung des Gewinnes an Ausschlußwahrscheinlichkeit durch die zusätzliche Anwendung des Esterase-D-Polymorphismus müssen Anzahl und Qualität (Verwendbarkeit) der bisher untersuchten Merkmale berücksichtigt werden.

Im Institut für Gerichtliche Medizin der Humboldt-Universität zu Berlin waren folgende Polymorphismen zur Vaterschaftsuntersuchung eingesetzt (Stand 1972):

| | |
|---|---|
| Saure Erythrocytenphosphatase (SEP) | V = 24,6 % |
| Glutamat-Pyruvat-Transaminase (GPT) | V = 10,7 % |
| Phosphoglucomutase ($PGM_1$) | V = 14,5 % |
| Adenosindesaminase (ADA) | V = 5,0 % |
| Alkalische Phosphatase (AP) | V = 3,5 % |
| 6-Phosphogluconatdehydrogenase (6-PGD) | V = 2,4 % |

Die Gesamtverwendbarkeit ( $V_{ges}$ ) beträgt dann

$$V_{ges} = 53{,}1\ \% .$$

Bei zusätzlicher Anwendung des Esterase-D-Polymorphismus erhöht sich dieser Wert auf

$$V'_{ges} = 67{,}0\ \% .$$

Der Gewinn an Ausschlußwahrscheinlichkeit ( $\Delta V$ ) beträgt somit:

$$\Delta V = V^{+}_{pre} - V_{pre}$$

$$\Delta V = 3{,}9\ \% \ .$$

Damit ist der Polymorphismus der Esterase 8 von der Frequenz seiner Allele, von der Bestimmungsschärfe, von der Umweltstabilität seiner Typen und von Erbgang her (unter den oben erwähnten Voraussetzungen) für die Anwendung in Paternitätsgutachten geeignet.

Als analytische Möglichkeit bietet sich der Nachweis der Esterase $A_2$ für anuraspezifische Zwecke an, da dieses Isoenzym spezifisch für neuroektodermales embryonales Hirngewebe ist.

## 6. ZUSAMMENFASSUNG

In allen Geweben des menschlichen Organismus kommen esterspaltende Enzyme vor.

Als Esterasen im engeren Sinne werden die Enzyme bezeichnet, die Ester kurzkettiger Carbonsäuren spalten.

Eine Substratspezifität liegt bei allen Esterasen nicht vor. Die Unterschiede zwischen verschiedenen Enzymen sind nur quantitativ.

Beim Menschen werden unter Verwendung der Zonenelektrophorese und von Naphtyl- und 4-Methyl-Umbelliferylestern als Nachweissubstrat 12 Isoenzymgruppen der Carboxylesterasen gefunden.

Sie werden als die Produkte von 5 verschiedenen Genorten angesehen. Diese Hypothese konnte bisher wegen der mangelnden genetischen Variabilität der Esterasen nicht überprüft werden.

Entsprechend ihren Unterschieden (elektrophoretische Mobilität, "Substratspezifität", Hemmbarkeit, Molekulargewicht) werden die Esterasen in A-, B-, C- und D-Isoenzyme eingeteilt.

Lediglich am Genort, der die Synthese der Esterase D steuert, wurden zwei häufige (Es $D^1$ und Es $D^2$) Allele und ein seltenes Allel (Es $D^3$) gefunden.

Die vorliegende Arbeit untersucht den Polymorphismus der erythrocytären Esterase-Isoenzyme unter der Bevölkerung des Berliner Raumes.

Zur Auftrennung der Esterase-D-Phänotypen wurde die Stärkegelelektrophorese eingesetzt. Der Nachweis der Isoenzymbanden erfolgte mit Hilfe des fluorogenen Substrates 4-Methyl-Umbelliferyl-Acetat.

Die Genfrequenzen Es $D^1$ = 0,682 und Es $D^2$ = 0,318 wurden gefunden. Der Vergleich von gefundener und erwarteter Phänotypenverteilung ergab bei

einer vorgegebenen Irrtumswahrscheinlichkeit von 5 % keine signifikanten Differenzen.

Die gefundenen Werte werden mit denen aus anderen Populationen verglichen. Es wird der Versuch unternommen, aus dem vorliegenden Untersuchungsmaterial (Ergebnisse der vorliegenden Arbeit und Literaturangaben) die Genfrequenzen der Es D - Allele für europäoide Populationen zu berechnen.

Die biologische und medizinische Bedeutung von Enzym- und Proteinpolymorphismen wird erläutert.

Die Möglichkeiten der Anwendung polymorpher genetischer Merkmale für die Vaterschaftsbegutachtung im allgemeinen und der Verwendung des Polymorphismus der Esterase D im besonderen werden diskutiert.

## 7. LITERATURVERZEICHNIS


ANELLA,E.; MARRINI,G.L.: Dissociation of lactate dehydrogenase subunits with guanidine hydrochloride. Biochem. Biophys. Res. Comm. 6, 171 (1961)

BARBARENA,M.; DOMENICI,F.; MORALI,A.: Red cell esterase D polymorphism in the population of Tuscany. Humangenetik 29, 251 (1975)

BECKER,P.: Untersuchungen zum Polymorphismus der Phosphoglucomutase-Isoenzyme (PGM$_2$). Diplom-Dissertation, Berlin 1974

BENDER,F.; FRANK, R.: Esterase-D-Polymorphismus: Darstellung in der Hochspannungselektrophorese und Mitteilung der Allelhäufigkeiten. Humangenetik 23, 315 (1974)

BERNHARD,W.-G.; GEDDE,M.M.: Esterase D polymorphism: Gene frequencies and family data. Humangenetik 24, 325 (1974)

BERNHARD,W.-G.; GEDDE,M.M.: Esterase D polymorphism in Assam by cellulose acetate electrophoresis. Humangenetik 24, 343 (1975)

BERGMEYER,H.U.: Methoden der enzymatischen Analyse. Akademie-Verlag, Berlin 1970

BERNET,J.: Reparaturvorgänge an der Desoxyribonucleinsäure. Angew. Chem. 85, 289(1973)

BEUTLER,E.; BALUDA,M.C.; STURGEON,P.; DAY,R.: A new genetic abnormality resulting in galactose-1-phosphate uridyltransferase. Lancet 353 (1960)

BEUTLER,E.; BALUDA,M.C.; STURGEON,P.; DAY,R.: The genetics of galactose-1-phosphate uridyltransferase deficiency. J. Lab. Clin. Med. 68, 646 (1966)

BEUTLER,E.; MITCHELL,M.: New rapid method for the estimation of red cell galactose-1-phosphate uridyltransferase activity. J. Lab. Clin. Med. 72, 527 (1968)

BEUTLER,E.: Screening for galactosemia. Studies of the gene frequencies for galactosemia and the Duarte variant. Isr. J. Med. Sci. 9, 1323 (1973)

BIESBORT,S.; KOMFF,J.: Population genetics of red cell galactose-1-phosphate uridyltransferase (E.C. 2.7.7.12). Humangenetik 17, 78 (1972)

BIESBORT,S.; KOMFF,J.: Galactose-1-phosphate-Uridyl-transferase (E.C. 2.7.7.12). Elektrophoretische Darstellung. Z. Rechtsmed. 72, 119 (1973)

BIESBORT,S.; KOMFF,J.: Red cell galactose-1-phosphate uridyltransferase (E.C. 2.7.7.12): Formal genetics and linkage relations. Humangenetik 18, 93 (1973)

BLAKE,N.M.; OMOTO,K.: Phosphoglucomutase types in the Asian-Pacific area: A critical review including new phenotypes. Ann. Hum. Genet. 38, 251 (1975)

BOYER,P.D.; LARDY,H.; MYRBACK,K.: The enzymes. New York and London 1960

BOYER,S.H.; FAINER,D.C.; WATSON-WILLIAMS,E.J.: Lactate dehydrogenase variant from human blood: evidence for molecular subunits. Science 141, 642 (1963)

BRADY,R.O.: Erbkrankheiten - Ursachen, Behandlung und Probleme. Angew. Chem. 85, 28 (1973)

CHACKO,C.M.; CHRISTIAN,J.C.; NADLER,H.L.: Unstable galactose-1-phosphate uridyltransferase: A new variant of galactosemia. J. Ped. 78, 454, (1971)

COATES,P.M.; MESTRINER,M.A.; HOPKINSON,D.A.: A preliminary genetic interpretation of the esterase isozymes of human tissues. Ann. Hum. Genet. 39, 1 (1975)

COHN,R.M.; SEGAL,S.: Galactose metabolism and its regulation. Metabolism 22, 627 (1973)

COLEMAN,R.E.; EPSTEIN,C.J.: Human red cell phosphoglucomutase: isozyme fractionation and labeling studies. Fed. Proc. 28, 843 (1969)

CROW,J.F.: The dilemma of nearly neutral mutations: How important are they for evolution and human welfare ? 9th Wilhelmine E. Key Lecture, University of Minnesota, Minneapolis 1972

DAWSON,D.M.; MITCHELL,A.: The isozymes of phosphoglucomutase. Biochemistry 8, 609 (1969)

DAWSON,D.M.; JAEGER,S.: Heterogeneity of phosphoglucomutase. Biochem. Genet. 4, 1 (1970)

EPSTEIN,C.J.; SCHECHTER,A.N.: An approach to the problem of conformational isozymes. Ann. N.Y. Acad. Sci. 151, 65 (1968)

EWENS,W.J.; FELDMAN,M.W.: Analysis of neutrality in protein polymorphism. Science 183, 446 (1974)

FISCHER,R.A.: The genetical theory of natural selection. Oxford 1929, New York 1958; zit. nach CROW (1972)

FORD,E.B.: Ecological genetics. London 1964

FUHRMANN,W.: Zur Genetik der Stoffwechseldefekte. Klin. Wschr. 49, 565 (1971)

GARROD,A.E.: Inborn errors of metabolism. London 1908 zit. nach WEICKER (1973)

GIBLETT,E.R.: Genetic markers in human blood. London and Colchester 1969

GITZELMANN,R.; POLEY,J.R.; PRADER,A.: Partial galactose-1-phosphate uridyltransferase deficiency due to a variant enzyme. Helv. paed. Acta 22, 255 (1967)

GITZELMANN,R.; BAERLOCHER,K.; PRADER,A.: Angeborene Defekte des Fruktose- und Galaktosestoffwechsels. Monatsschr. Kinderheilk. 121, 174 (1973)

HARRIS,H.: Genes and isozymes. Proc. Roy. Soc., Lond. 174, 1 (1969)

HARRIS,H.: Protein polymorphism in man. Ann. J. Genet. Cytol. 13, 381 (1971)

HARRIS,H.; HOPKINSON,D.A.; ROBSON,E.B.: The incidence of rare alleles determining electrophoretic variants: Data on 43 enzyme loci in man. Ann. Hum. Genet. 37, 237 (1974)

HARRIS,H.: The principles of human biochemical genetics. Amsterdam, Oxford and New York 1975

HARTMANN,F.E.; SUSKIND,S.R.: Die Wirkungsweise der Gene. Gustav Fischer Verlag, Jena 1972

HERBICH,J.; PESENDORFER,F.: Anwendung des Enzymsystems der Erythrozyten-Phosphoglucomutase bei der Vaterschaftsbegutachtung. Wien. Klin. Wschr. 81, 1 (1969)

HILL,H.Z.; PUCK,T.T.: Detection of inborn errors of metabolism: Galactosemia. Science 179, 1136 (1973)

HIRSZFELD,L.: Probleme der Blutgruppenforschung. Gustav Fischer Verlag, Jena 1960

HOPKINSON,D.A.; HARRIS,H.: Evidence for a second "structural" locus determining human phosphoglucomutase. Nature 208, 410 (1965)

HOPKINSON,D.A.; HARRIS,H.: A third phosphoglucomutase locus in man. Ann. Hum. Genet. 31, 359 (1968)

HOPKINSON,D.A.; HARRIS,H.: Red cell acid phosphatase, phosphoglucomutase and adenylate kinase. In: YUNIS,Y.: Biochemical methods in red cell genetics. Acad. Press, New York and London 1969

HOPKINSON,D.A.; HARRIS,H.: Recent work on isozymes in man. Ann. Rev. Genet. 5, 5 (1971)

HOPKINSON,D.A.: Molecular aspects of genetic polymorphism. Biochimie 54, 575 (1972)

HOPKINSON,D.A.; MESTRINER,M.A.; CORTNER,J.; HARRIS,H.: Esterase D: A new human polymorphism. Ann. Hum. Genet. 37, 119 (1973)

HOPKINSON,D.A.; COPPOCK,J.S.; MONLEHANN,N.F.; EDWARDS, Y.H.: The detection and differentiation of the products of the human carbonic anhydrase loci CA I and CA II using fluorogenic substrates. Ann. Hum. Genet. 38, 155 (1974)

ICHIMOTO,S.; KUWATA,N.; FUJITA,H.: Esterase D polymorphism in Japanese. Jap. J. Human Genet. 19 (2), 157 (1974)

ISSELBACHER,K.J.: Uridyltransferase. In: BERGMEYER,H.U.: Methoden der enzymatischen Analyse. Akademie - Verlag, Berlin 1970

IUB: Report of the Commission on Enzymes of the IUB Oxford, London, New York and Paris 1961

IUPAC-IUB: Commission on Biochemical Nomenclature (CBN): Nomenklatur multipler Enzyaformen (Empfehlungen 1971). Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 353, 651 (1972)

JOOMX,J.G.; HANDLER,P.: Phosphoglucomutase. VI. Purification and properties of phosphoglucomutase from human muscle. J. Biol. Chem. 244, 3943 (1969)

KALCKAR,H.M.; ANDERSON,E.P.; ISSELBACHER,K.J.: Galactosemia: a congenital defect in a nucleotide transferase. Biochem. Biophys. Acta 20, 262 (1956)

KALOUD,H.; SITZMANN,F.C.: Ergebnisse klinischer und biochemischer Untersuchungen bei einer Sippe mit Erkrankungen an Galaktosämie. 54. Beiheft zum Arch. Kinderheilk. (1971)

KAPLAN,N.O.: Nature of multiple molecular forms of enzymes. Ann. N.Y. Acad. Sci. 151, 302 (1968)

KIMURA,M.: Evolutionary rate at the molecular level. Nature 217, 624 (1968)

KIMURA,M.: The rate of molecular evolution considered from the standpoint of population genetics. Proc. Nat Acad. Sci. 63, 1181 (1969)

KIMURA,M.; OTHA,T.: Protein polymorphism as a phase of molecular evolution. Nature 229, 467 (1971)

KING,J.L.; JUKES,T.H.: Non-darwinian evolution. Science 164, 788 (1969)

KOSTER,B.; LEUPOLD,M.; MAUFF,G.: Esterase D polymorphism. High voltage agarose-gel electrophoresis and distribution of phenotypes in different european populations. Humangenetik 22, 75 (1973)

KOMROWSKI,E.M.; SCHWARZ,V.; HOLZEL,A.; GOLDBERG,L.: A clinical and biochemical study of galactosemia. A possible explanation of the nature and biochemical lesion. Arch. Dis. Childh. 31, 264 (1956)

KORALEWSKI,A.L.: Die Isoenzyme der Lactatdehydrogenase. Georg Thieme Verlag, Stuttgart 1972

KRAHL,F.; HERRICH,L.; SPIELMANN,W.: Untersuchungen zum Polymorphismus der Galaktose-1-Phosphat-Uridyltransferase [E.C. 2.7.7.12] mittels Agarosegel - elektrophorese. Humangenetik 24, 227 (1974)

KRAHL,F.; HERRICH,L.; SPIELMANN,W.: Untersuchungen zum Polymorphismus der intraerythrozytären Esterase D (Es D) mittels Hochspannungselektrophorese auf Agarosegel. Z. Rechtsmed. In Druck, zit. nach MARTIN und OTT (1975)

LEWONTIN,R.C.; KOJIMA,K.: Distribution of gene frequency as a test of the theory of the selective neutrality of polymorphisms. Genetics 74, 175 (1973)

LI,W.-H.: Total numbers of individuals affected by deleterious mutant genes in a finite population. Ann. Hum. Genet. 38, 333 (1975)

MAYER,J.A.; HOWARD,F.N.; REILY,J.R.: Re-evaluation of a galactosemic family by enzymatic and electrophoretic methods. J. Pediatr. 82, 476 (1973)

MARMUR,C.L.: The molecular basis for isozymes. Ann. N.Y. Acad. Sci. 151, 14 (1968)

MARTIN,W.; KIRSCHKE,G.: Polymorphismus der menschlichen Erythrozyten-Uridyltransferase (E.C. 2.7.7. 12). Untersuchungen an einer Stichprobe aus der Berliner Bevölkerung. Blut 30, 89 (1975)

MARTIN,W.; OTT,A.: Polymorphismus der menschlichen Erythrozyten-Esterase D. Phänotypenverteilung und Genfrequenzen in Berlin (West). Blut 30, 299 (1975)

McALPINE,P.J.; HOPKINSON,D.A.; HARRIS,H.: The relative activities attributable to the three phosphoglucomutase loci ($PGM_1$, $PGM_2$, $PGM_3$) in human tissues. Ann. Hum. Genet. 34, 169 (1970)

MARYAMA,T.; MIMURA,M.: Geographical uniformity of selectively neutral polymorphisms. Nature 249, 30 (1974)

Mc KUSICK,V.A.: Humangenetik. Gustav Fischer Verlag, Jena 1968

MATHAI,C.K.; BEUTLER,E.: Electrophoretic variation of galactose-1-phosphate uridyltransferase. Science 154, 1179 (1966)

MATZ,D.; ENZENAUER,J.; NENNE,F.: Über einen Fall von atypischer Galaktosämie. Humangenetik 27, 309 (1975)

MELLMANN,W.J.; TEDESCO,T.A.; FEIGL,P.: Estimation of the gene frequencies of the Duarte variant of galactose-1-phosphate uridyltransferase. Ann. Hum. Genet. 32, 1 (1968)

MOHN,E.: Relation between blood cell phosphoglucomutase isozymes and age of cell population. Scand. J. Haematol. 6, 1 (1969)

MUELLER,E.: Gerichtliche Medizin. Berlin, Heidelberg und New York 1975

MYERS,D.K.: Carboxylester cleavage. In: BOYER,P.D.; LARDY,H.; MYRBACK,K.: The enzymes. Volume 4, Hydrolytic cleavage. New York and London 1960

NEI,M.; ROYCHOUDHURY,A.K.: Genetic variation within and between the three major races of man, Caucasoids, Negroids and Mongoloids. Am. J. Hum. Genet. 26, 421 (1974)

NEVO,E.: Test of selection and neutrality in natural populations. Nature 244, 573 (1973)

NO,H.G.; BERGREN,W.R.; FIELDS,M.; POWELL,V.M.: An improved electrophoretic procedure for galactose-1-phosphate uridyltransferase. Demonstration of

multiple activity bands with the Duarte Variant. Biochem. Biophys. Res. Commun. 37, 364 (1969)

NG,W.G.; BERGREN,W.R.; DONNELL,G.N.: A new variant of galactose-1-phosphate uridyltransferase in man: The Los Angeles variant. Ann. Hum. Genet. 37, 1 (1973)

NG,W.G.: Galactose metabolism of the red cell. Exp. Eye Res. 11, 402 (1971)

PFLEIDERER,G.; WACHSMUTH,E.D.: Alters- und funktionsabhängige Differenzierung der Lactatdehydrogenase menschlicher Organe. Biochem. Z. 334, 185 (1961)

PILZ,W.: Arylesterasen . In: BERGMEYER,H.U.: Methoden der enzymatischen Analyse. Akademie-Verlag, Berlin 1970

PROKOP,O.; UHLENBRUCK,G.: Lehrbuch der menschlichen Blut- und Serumgruppen. Leipzig 1966

PROKOP,O.: Die menschlichen Blut- und Serumgruppen. Gustav Fischer Verlag, Jena 1971

RADAM,E.: Zur Genetik und Populationsdynamik erblicher Pseudocholinesterase-Varianten. Dtsch. Zschr. ges. Gerichtl. Med. 57, 222 (1965)

RADAM,G.: Erblich bedingte Defekte der Phosphoglucomutase-Varianten. Ärztl. Lab. 16, 7 (1969)

RADAM,G.: Methoden und Daten zur Anwendung genetisch polymorpher Enzymsysteme in der forensischen Medizin. Habil. Schrift, Berlin 1972

RAPOPORT,S.M.: Medizinische Biochemie. Verlag Volk und Gesundheit, Berlin 1975

RICHTERICH,R.: Serumcholinesterase. In: SIEGENTHALER, W.: Klinische Pathophysiologie. Georg Thieme Verlag, Stuttgart 1973

SCHMIDT,R.: Blutgruppenserologie. In: MUELLER,B.: Gerichtliche Medizin. Berlin, Heidelberg und New York 1975

SMITH,E.D.; TWAITS,H.: Further studies on the genetics of placental alkaline phosphatase.

Hum. Genet. 30, 239 (1967)

[illegible]: Rhabdomyolysis in der nervenärztlichen Sprechstunde. Med. Welt 23, 322 (1972)

[illegible]: KAPLAN, [illegible]: Electrophoretic abnormality of galactose-1-phosphate uridyltransferase in galactosemia. Biochem. Biophys. Res. Commun. 28, 541 (1967)

[illegible]: Ergebnisse des europäischen Screening-programmes auf hereditäre Stoffwechselstörungen. Monatsschr. Kinderheilk. 121, 205 (1973)

[illegible]: BARTO, [illegible]: Genetic evidence for the subunit structure of lactate dehydrogenase isozymes. Proc. Nat. Acad. Sci. 50, 211 (1963)

[illegible]: BEAM, [illegible]: Gene markers for mapping the human genome. Report of the Committee on Genetic Markers 1973

[illegible]: Klinische Pathophysiologie, Gustav Fischer Verlag, Stuttgart 1973

[illegible]: Populationsgenetik. Gustav Fischer Verlag, Jena 1973

[illegible]: [illegible] substance polymorphism in man. Nature 204, 742 (1964)

[illegible]: Zone electrophoresis in starch gels: Group variations in the serum proteins of normal human adults. Biochem. Z. 61, 629 (1965)

[illegible]: Multiple forms of esterases from human erythrocytes. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 100, 301 (1959)

[illegible]: The esterases and [illegible] in red cell genetics. Acad. Press, New York and London 1969

[illegible]: [illegible]: Galactosemia: Evidence for a structural gene mutation. Science 172, 727 (1971)

Aus dem Institut für Gerichtliche Medizin der
Humboldt-Universität zu Berlin
Direktor: Prof. Dr. sc. med. O. Prokop

T h e s e n  z u r  D i s s e r t a t i o n

# D I E  M E N S C H L I C H E N  E S T E R A S E -
# I S O E N Z Y M E

Untersuchungen zum Polymorphismus der Esterase D

vorgelegt von Dipl. Med. Detlef Becker

I. Isoenzyme sind Proteine mit derselben katalytischen Aktivität. Sie weisen genetisch bedingte Unterschiede in ihrer Aminosäuresequenz auf. Je nach Art und Lokalisation der Veränderung sind Unterschiede im Molekulargewicht, in der elektrophoretischen Beweglichkeit, in den kinetischen und immunologischen Eigenschaften zwischen den Isoenzymen vorhanden, welche die Grundlage ihrer Auftrennung bilden.

II. Die Synthese von polymorphen Isoenzymen und seltenen genetischen Varianten wird von verschiedenen Allelen eines Genortes (Strukturgens) gesteuert. Allele entstehen durch Punktmutationen in der DNS des entsprechenden Genortes. Die Häufigkeit alleler Gene in der Population resultiert aus dem Zusammenwirken von Mutation, Selektion und genetischer Zufallsdrift.

III. Der genetische Polymorphismus kann allgemein entweder als echtes genetisches Gleichgewicht - entstanden durch balancierende Selektion - oder als Durchgangsphase der Evolution aufgefaßt werden, die gekennzeichnet ist von der Verdrängung eines präexistierenden Allels durch eine Mutante (Selektion oder genetische Zufallsdrift).

IV. Der Proteinpolymorphismus und die seltenen genetischen Varianten bilden gemeinsam die Grundlage für die besonderen biochemischen Kennzeichen eines Individuums, die sogenannte individuelle chemische Individualität. Diese gestattet es, mit einer bestimmten Wahrscheinlichkeit Aussagen zur Identität von Personen auf Grund

chemischer Untersuchungen von Körperflüssigkeiten und -geweben zu machen.

V. Auf diese biochemische Individualität gründet sich die Anwendung biochemischer, genetischer Merkmale für die Vaterschaftsbegutachtung und für spurenkundliche Zwecke. Die Aussagekraft einer solchen Analyse hängt von der Häufigkeit der untersuchten Genotypen in der Population ab und wird im Einzelfall von mehreren Einzelfaktoren modifiziert: Art der Fragestellung, Anzahl der gleichzeitig untersuchten Merkmale und Haltbarkeit des Untersuchungsmaterials.

VI. Eine klinische Bedeutung genetisch bedingter Isoenzymvarianten ist nur für eine Reihe von inaktiven Genprodukten sogenannter Defektallele nachgewiesen. Diese führen im Organismus homozygoter Träger des Defektallels zur Hemmung der entsprechenden Reaktion im Intermediärstoffwechsel mit allen ihren Folgen (Stoffwechselblockierung). Beim größten Teil häufiger und seltener Allele gibt es keine nachweisbaren Auswirkungen auf den Stoffwechsel. Deswegen sind die meisten polymorphen Enzyme für klinische Fragestellungen von untergeordneter Bedeutung. Für die Lebensdisposition spielen sie aber insofern eine wichtige Rolle, [illegible] sie eine der Ursachen für die biologisch bedingte Variationsbreite klinisch-chemischer Meßwerte sind (biochemische Individualität).

Isoenzyme, deren Synthese von verschiedenen Genorten gesteuert wird und deren Spaltungsprodukte [illegible]

Die verschiedenen Esterase-Isoenzyme unterscheiden sich durch Molekulargewicht, Substratspezifität, Hemmbarkeit, Gewebeverteilung und Aktivitäten während der Embryonal- und Foetalentwicklung.

II. HOPKINSON et al. (1973) entdeckten bei Einsatz von 4-Methylumbelliferylestern als Substrat die Gruppe der D-Esterasen. Dieses System wird von einem Genort gesteuert, an dem in allen bisher untersuchten Populationen (Europäide, Negride, Mongolide) zwei häufige Allele ($Es\ D^1$ und $Es\ D^2$) vorkommen. Außerdem wurde bisher ein seltenes Allel beschrieben ($Es\ D^3$).

III. Die Bedingungen für die Anwendung des Esterase-D-Polymorphismus zur Vaterschaftsbegutachtung sind im wesentlichen gegeben. Der Erbgang ist autosomal und kodominant. Die Esterase-D-Typen sind bereits beim Foeten eindeutig nachweisbar. Die Auftrennung erfolgt mit Hilfe der Stärkegelelektrophorese und dem Nachweis der Isoenzymbanden mit dem Essigsäureester des fluorogenen Substrates 4-Methyl-Umbelliferon.

IV. Im Berliner Raum ergab die Untersuchung von [illegible] nichtverwandten Personen folgende Häufigkeiten:

Es D 1 = 0,796
Es D 2-1 = 0,201
Es D 2 = 0,003 .

Da der statistische Vergleich mit der zu erwartenden HARDY-WEINBERG-Verteilung keine signifikanten Differenzen zeigt ( $\alpha$ = 5 %), konnten die Genfrequenzen $Es\ D^1$ = 0,897 und

Es $D^2 = 0{,}103$ sowie die durchschnittliche Ausschlußwahrscheinlichkeit für Nichtväter ($V = 8{,}4$ %) berechnet werden.
Eine Gegenüberstellung mit den bereits untersuchten Enzympolymorphismen ergab einen Zuwachs an Ausschlußwahrscheinlichkeit von 3,9 % durch die zusätzliche Anwendung des Systems der Esterase D.

XIII. Der Polymorphismus der Esterase-D-Isoenzyme ist von der Frequenz seiner Allele her für den Vaterschaftsausschluß geeignet. Die Voraussetzungen kombinanter Erbgang, einfache und zuverlässige Bestimmungsmethode sowie Umweltstabilität des Merkmals sind gegeben.
Es fehlen allerdings noch der Ausschluß einer engen Koppelung zu anderen Genorten im Erbgang und der Ausschluß stummer Gene (Defektallele) durch entsprechend große Untersuchungsreihen.
Für spurenkundliche Zwecke bietet sich außerdem die Möglichkeit des Nachweisen der für embryonales Hirngewebe spezifischen Esterase-$A_7$-Isoenzym[illegible]